

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DANILO LOPES FERRUCCI

**Dietas com diferentes perfis lipídicos alteram o
transcriptoma e o crescimento da próstata**

Campinas, 2016

DANILO LOPES FERRUCCI

Dietas com diferentes perfis lipídicos alteram o transcriptoma e o crescimento da próstata

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica

ORIENTADOR: Hernandes Faustino Carvalho

Este arquivo digital corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno (**Daniilo Lopes Ferrucci**) e orientada pelo Dr. Hernandes F. Carvalho .

Campinas, 2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 148888/2011-9

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F418d Ferrucci, Danilo Lopes, 1982-
Dietas com diferentes perfis lipídicos alteram o transcriptoma e o crescimento da próstata / Danilo Lopes Ferrucci. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Hernandes Faustino de Carvalho.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Próstata. 2. Dieta. 3. Ácidos graxos. 4. Transcriptoma. 5. Crescimento. I. Carvalho, Hernandes Faustino de, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Dietary fatty acid quality affects the prostate transcriptome and growth

Palavras-chave em inglês:

Prostate

Diet

Fatty acids

Transcriptome

Growth

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Hernandes Faustino de Carvalho [Orientador]

Dora Maria Grassi Kassisse

William Tadeu de Lara Festuccia

Marcelo Alves da Silva Mori

Katia Ramos Moreira Leite

Data de defesa: 29-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 29 de fevereiro de 2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassis

Prof. Dr. William Tadeu de Lara Festuccia

Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva Mori

Profa. Dra. Katia Ramos Moreira Leite

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João Ferrucci e Luciana Lopes;

Aos meus irmãos Leonardo Ferrucci e Juliana Ferrucci;

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

À Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, pelo dom da vida, por me proporcionar saúde, força, luz, perseverança e acima de tudo me guiar ao longo dessa jornada e dos desafios do mistério da vida.

Aos **componentes da banca** deste trabalho, pela disponibilidade e generosidade em contribuir para seu enriquecimento. Muito obrigado pela contribuição na conclusão de mais uma etapa da minha carreira acadêmica e profissional.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, em especial a **Andreia Ap. Vigilato dos Santos** e a Profa. Dra. **Carmen Veríssimo** pelo carinho, atenção e profissionalismo, obrigado.

À minha **família**, sem a qual este momento não seria possível! Aos meus pais pela criação e educação ímpar. Ao meu **pai**, exemplo de honestidade, garra e inteligência, saiba que esse trabalho é fruto da sua educação e, que embora hoje distantes, nunca é tarde pra dizer, obrigado por tudo. **Mãe**, não tenho palavras pra descrever o quanto sou grato por tudo o que fez por seus filhos ao longo desses anos, sem dúvida alguma você é um anjo que Deus colocou na minha vida, a pessoa mais incrível desse mundo, o eterno amor da minha vida, exemplo de compreensão, bondade e carinho, amo você, obrigado. Ao **meu irmão**, exemplo de garra, força, coragem, inteligência e honestidade. À **minha irmã**, exemplo de serenidade, carinho, compaixão, garra, minha irmã caçula e minha protegida.

Aos **amigos do: Laboratório de Bioquímica do Exercício** (Paulo Gandra, Lucas Tessuti, Fernando Catanho, Bernardo Neme Ide, Charles Ricardo Lopes, Thiago Lourenço, Eduarda Machado, Rodrigo Hohl, Fernanda Lazarim, Mirtes Stancanelli, Mário Sarraipa, Renato Buscariolli, Juliana Pascuotte, Rodrigo Ferraresso, Ana Porto, Rafael), **Laboratório de Imunologia Aplicada** (Luís Peroni, Juliete Aparecida Silva, José Raimundo) e do **Laboratório de Matriz extracelular** (Ana Deckmann, Aline Siqueira, Ariane Tocci, Danilo Damas, Guilherme Barbosa, Rafaela da R.Ribeiro, Sílvia Pimentel, Manoel Biancardi, Andres Osório, Umar Nisham, Leandro), obrigado por estarem presentes na minha vida em diversos momentos de discussões, aprendizagem e troca de experiências profissionais e pessoais. Sem fazer menção em particular, até para não cometer injustiça, sou grato

a TODOS pela contribuição ao longo da minha carreira profissional e acadêmica, mas acima de tudo na vida pessoal. Obrigado queridos amigos e amigas.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Hernandes F.Carvalho**, pela confiança, oportunidade, competência, disponibilidade e acompanhamento do trabalho ao longo destes anos de doutorado, assim como pelas críticas, correções, sugestões e acima de tudo por todos os ensinamentos que vão além da orientação. Muito obrigado por tudo.

À **Prof. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado**, por ter aberto as portas o seu laboratório durante o meu mestrado, pela orientação, por ter confiado no meu empenho e competência, mas acima de tudo pela amizade e momentos compartilhados ao longo desses seis anos de convivência. Espero que essa cooperação e amizade permaneça por muitos e muitos anos. Muito obrigado.

À **Dra. Denise Vaz de Macedo**, por ter me acolhido junto à família Labex ao longo de 10 anos, onde iniciei minha jornada no campo da pesquisa, ensino e extensão. Obrigado pela oportunidade e aprendizagem. Sou grato pelas experiências e momentos vivenciados ao longo desses 10 anos que contribuíram, sem dúvida, de forma inestimável na minha formação pessoal e profissional. Muito Obrigado.

À **Unicamp e ao Laboratório de matriz extracelular**, pela infraestrutura concedida para minha formação e conclusão deste trabalho.

Ao **CNPq** e a **FAPESP**, por fomentar financeiramente este trabalho.

I. RESUMO

Fatores ambientais e nutricionais estão associados à etiologia das prostatites, da hiperplasia prostática benigna e do câncer de próstata. Os lipídios em geral e os ácidos graxos em particular são considerados importantes mediadores dietéticos destes efeitos. No presente trabalho exploramos a hipótese de que diferentes perfis lipídicos, mesmo em dietas normolipídicas (7%) influenciam o crescimento e a fisiologia prostática, criando padrões diferenciais de expressão gênica, que resultam em maior susceptibilidade e/ou incidência de diferentes afecções prostáticas. Dessa forma, submetemos camundongos C57/BL6 a dietas normolipídicas baseadas em óleo de linhaça, óleo de soja ou banha de porco [(que variam no conteúdo de ácidos graxos saturados e insaturados e na razão ω -3/ ω -6 (ω ratio)] por 12 ou 32 semanas após desmame, e realizamos análise de parâmetros estruturais e funcionais da glândula prostática, e sua inserção num contexto metabólico sistêmico. Análises adicionais foram realizadas no gerbilo da Mongólia, que apresenta desvio metabólico para baixo consumo de água (i.e dependem de oxidação de ácidos graxos para obtenção de água metabólica). A dieta baseada em óleo de linhaça (67,4% de ácidos graxos poliinsaturados, ω -ratio=3,70) resultou num perfil metabólico predominantemente termogênico, enquanto a dieta baseada em óleo de soja (52,7% de ácidos graxos poliinsaturados, ω -ratio = 0,11) resultou em maior crescimento corporal e adiposidade. Nos camundongos, a banha de porco (13,1% de ácidos graxos poliinsaturados, ω -ratio = 0,07) promoveu um perfil de crescimento bifásico, inicialmente estimulando o ganho de peso, mas resultando em menor adiposidade nos camundongos adultos tratados durante o período de 32 semanas. Ao contrário da dieta baseada em óleo de linhaça, soja e banha resultaram respectivamente em esteatose hepática e esteatohepatite. Nenhuma das três dietas apresentou efeito marcante na captação periférica de glicose, porém a função glicêmica e a produção de insulina mostraram-se alteradas nos animais alimentados com soja e banha. Banha e soja estimularam o crescimento da glândula e aumento no volume do epitélio prostático, sendo que na banha, constatamos o aspecto de hiperplasia epitelial. Ao contrário, a linhaça resultou em órgãos menores e zonas de atrofia epitelial. Infiltrados inflamatórios foram frequentes no grupos banha (predominantemente estromal) e linhaça (predominantemente luminal). Curiosamente, estes grupos que possuíam inflamação na trigésima segunda semana apresentaram ontologias associadas à inflamação reveladas pelas análises

de RNAseq realizadas às 12 semanas. Após 32 semanas de exposição às dietas baseadas em linhaça e banha, o transcriptoma revelou ontogenias relacionadas ao estresse de retículo endoplasmático e a ativação da via de resposta adaptativa ao estresse de retículo (UPR – *Unfolded Protein Response*). Em conclusão, diferentes perfis de ácidos graxos presentes em dietas normolipídicas afetam de forma estereotipada diversos aspectos sistêmicos e da próstata, resultando em atrofia ou hiperplasia epitelial associadas ou não a prostatites não-infecciosas, cujas combinações aumentam a predisposição à carcinogênese.

Palavras chaves : Próstata, dieta, ácidos graxos, transcriptoma, crescimento.

II. ABSTRACT

Environmental and nutritional factors are associated to prostatitis etiology, benign prostate hyperplasia and prostate cancer. General lipids and in particular fatty acids are important dietary agents in these diseases. In the current work, we hypothesized that different dietary fatty acids profiles even in normolipidic diets (7%), modulate the prostatic growth and physiology, generating differential gene expression patterns, resulting in increased susceptibility and/or incidence of prostate disorders. In this way, we fed male C57/BL6 mice with normolipidic diets based on linseed oil, soybean oil or lard [(which have difference on content of saturated and unsaturated fatty acid and ratio ω -3 / ω -6 (ω ratio))] by 12 and 32 weeks after weaning, and conducted a comprehensive analysis of structural and functional parameters of prostate gland inserting it in a systemic metabolic context. Additional analyzes were performed in male Mongolian gerbil, because it presents metabolic deviation and low water consumption (i.e it depends on fatty acids oxidation for production of metabolic water). Linseed oil based diet (67.4% of polyunsaturated fatty acids, ω -ratio = 3.70) resulted predominantly in a thermogenic metabolic profile, while a soybean oil-based diet (52.7% of polyunsaturated fatty acids, ω -ratio = 0.11) increased body growth and fatness. Mice fed on lard-based diet (13.1% of polyunsaturated fatty acids, ω -ratio = 0.07) promotes a biphasic profile of growth, initially stimulating weight gain, but resulting in decrease of adiposity and body weight growth in adult male mice. Contrary to the linseed oil-based diet, soy and lard based-diet resulted also in hepatic steatosis and steatohepatitis, respectively . Lard and soybean-based diet increased prostate growth and the prostatic epithelial volume, and lard resulted in a prostate growth associated with epithelial hyperplasia as well. Differentially, linseed oil-based diet group presented reduction of prostate growth and atrophic epithelium. Inflammatory cells were frequently present in lard (predominantly stromal) and linseed oil-based diet (luminal predominantly). Interestingly, these groups with increased inflammatory cells (32 weeks of diet), showed enriched inflammation ontologies revealed with RNAseq analyzes performed at 12 weeks. After 32 weeks of exposure to diets based on linseed and lard, the transcriptome revealed ontologies related to endoplasmic reticulum stress. In conclusion, different fatty acids profiles at normolipidic diets affect stereotypically several systemic and prostatic aspects,

resulting in atrophy or epithelial hyperplasia associated or non to non-infectious prostatitis, whose combinations could increase the predisposition to carcinogenesis.

Palavras chaves : Prostate, diet, fatty acids, transcriptome, growth.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alterações fenotípicas e metabólicas ocasionadas pela manipulação do perfil lipídico dietético.....	45
Figura 2. Dietas compostas por diferentes perfis lipídicos modulam diferencialmente o metabolismo energético e a termogênese no tecido adiposo de camundongos C57/BL6.	48
Figure 3. Dietas compostas por diferentes perfis lipídicos modulam a proliferação epitelial e o crescimento da glândula prostática.....	51
Figura 4. Dietas compostas por diferentes perfis lipídicos modulam as concentrações séricas de hormônios e citocinas pró-inflamatórias..	53
Figure 5. Dietas compostas por diferentes perfis de ácidos graxos modulam o sistema imune e a resposta inflamatória na próstata de camundongos.....	55
Figure 6. Dietas com diferentes perfis lipídicos modulam diferencialmente a expressão de genes relacionados ao enovelamento protéico, ao estresse de retículo e à resposta adaptativa ao acúmulo de proteínas desenoveladas (Unfolded Protein Response - UPR).....	58
Figure 7. A inflamação e as lesões na próstata do Gerbilo da Môngolia são moduladas pelo perfil lipídico da dieta.....	61
Figure Suplementar 1. Alterações fenotípicas e metabólicas ocasionadas pela manipulação do perfil lipídico dietético.....	82
Figura Suplementar 2: Dietas compostas por diferentes perfis lipídicos modulam o crescimento da glândula prostática.	84
Figura Suplementar 3. Alterações no perfil de hormônios e citocinas plasmáticas ocasionadas pela manipulação do perfil lipídico dietético.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais - AIN93-G	38
Tabela S1 . Análise físico-química das dietas experimentais AIN93-G.....	80
Tabela S2 . Composição de ácidos graxos dos óleos utilizados nas dietas experimentais, conforme análise realizada por cromatografia gasosa.	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGPI – Ácido graxo poli-insaturado
ALA – Ácido α -linolênico
AR – Andrógeno Receptor
CGC – Capillary Gas Chromatograph
DHA – Ácido Docosahexanóico
DPC – Dias pós concepção
EPA – Ácido Eicosapentaenóico
FC – Fold Change
GTT – Teste de Tolerância à Glicose
HFD – Dieta Hiperlipídica
iBAT – Interescapular brown adipose tissue
IL-1 β – Interleucina 1 β
IL-23 – Interleucina 23
IL-6 – Interleucina 6
eWAT – Epididimal white adipose tissue
iWAT – Inguinal white adipose tissue
IMC – Índice de Massa Corpórea
INCA – Instituto Nacional de Câncer
IP - Intraperitoneal
ITT – Teste de Tolerância à Insulina
KITT – Constante de Decaimento da Glicose
LO – Linseed oil
MCP-1 – Proteína 1 quimiotática para monócitos
NEKS – NIMA-related Kinases
NFD – Dieta normolipídica

NIMA – Never in Mitoses, gene A
ND – Não detectado
P-adj – pvalor ajustado para múltiplos testes
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PD – Próstata Dorsal
PF – Pork Fat
PL – Próstata lateral
PUFA – Polyunsaturated fatty acids
PV – Próstata ventral
SCD1 – Stearoyl-CoA desaturase-1 (Estearoil-CoA dessaturase-1)
SFAs – Saturated fatty acids
SO – Soybean oil
TLR-4 – Receptor do Tipo Toll Like 4
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α
UGE – Porção epitelial do seio urogenital
UGM – Porção mesenquimal do seio urogenital
UGS – Seio urogenital
VMP – Pé mesenquimal ventral
 ω -ratio – razão entre ω 3/ ω 6
 ω 3 – Ômega-3
 ω 6 – Ômega-6
 ω 7 – Ômega-7
 ω 9 – Ômega-9

SUMÁRIO

I. RESUMO	08
II. ABSTRACT	10
III. INTRODUÇÃO	17
Aspectos evolutivos intrínsecos à alteração do padrão alimentar na sociedade moderna	17
Anatomia da próstata	19
Aspectos histológicos e morfofisiológicos da próstata	20
Organogênese Prostática	22
Ácido graxos Poliinsaturados	24
O perfil lipídico dietético modula o desenvolvimento e a incidência de doenças associadas a próstata?	26
IV. HIPÓTESE	29
V. OBJETIVO GERAL	29
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
Artigo: Ácidos graxos presentes na dieta causam diferentes alterações sistêmicas e da glândula prostática que incluem prostatites, hiperplasia epitelial e lesões pré-neoplásicas	31
ABSTRACT	32
VII. DISCUSSÃO	64
VIII. CONCLUSÕES	71
IX. BIBLIOGRAFIA	73
X. TABELAS E FIGURAS SUPLEMENTARES	80
XI. ANEXOS	87
ANEXO 1 – Lista de genes diferencialmente expressos em animais tratados por doze semanas com dieta baseada em banha de porco quando comparado aos animais tratados com dieta baseada em óleo de soja. P-adj: 0,10.	87
ANEXO 2 – Lista de genes diferencialmente expressos em animais tratados por doze semanas com dieta baseada em banha de porco quando comparado aos animais tratados com dieta baseada em óleo de linhaça. P-adj: 0,10.	99

ANEXO 3 – Lista de genes diferencialmente expressos em animais tratados por trinta e duas semanas com dieta baseada em banha de porco quando comparado aos animais tratados com dieta baseada em óleo de soja. P-adj: 0,10.	104
ANEXO 4 – Lista de genes diferencialmente expressos em animais tratados por trinta e duas semanas com dieta baseada em banha de porco quando comparado aos animais tratados com dieta baseada em óleo de linhaça. P-adj: 0,10.....	114
ANEXO 5 – Protocolo comitê de ética	117
ANEXO 6 – Declaração: Bioética e Biossegurança	118
ANEXO 7 – Declaração: direito autoral.....	119

III. INTRODUÇÃO

Aspectos evolutivos intrínsecos à alteração do padrão alimentar na sociedade moderna

O padrão alimentar, a inatividade física, a alta incidência de sobrepeso, a obesidade e o alto índice de adiposidade corporal¹ têm sido apontados na sociedade moderna como fatores determinantes no aumento de diferentes doenças, como a diabetes (Tipo 2), doenças cardiovasculares, hipertensão e a síndrome metabólica, chamadas também de distúrbios ou doenças da civilização moderna (EATON; KONNER; SHOSTAK, 1988). Segundo algumas teorias, esse aumento ocorre porque nosso genoma moldado por milhões de anos, sofreu pequenas alterações diante à alterações tão bruscas nos hábitos de vida adquiridos com a revolução agrícola, industrial, e tecnológica (BOOTH et al., 2000, 2011).

Evolutivamente, nosso genoma é um retrato da seleção natural e das diferentes pressões evolutivas ocasionadas devido às interações com o ambiente por múltiplas gerações ao longo do tempo. Desde a origem da primeira espécie do gênero Homo, o genoma de nossos ancestrais tornou-se adaptado ao ambiente e ao perfil de caçadores e coletores, alcançando o equilíbrio, definido como uma interação ótima entre o ambiente e o genoma, que favoreceu a sobrevivência da espécie e o sucesso reprodutivo (KUIPERS; JOORDENS; MUSKIET, 2012; TREMBLAY et al., 2008).

A história evolutiva codificada em nosso genes pode ser considerada então resultado de pressões evolutivas ao longo de muitos anos (2,6 milhões~10.000 atrás), onde as atividades relacionadas a sobrevivência e a reprodução da espécie, contribuíram para seleção de genótipos relacionados a um estilo de vida onde era predominante altos níveis de atividade física e alimentação intermitente (MANHEIMER et al., 2015). Como consequência, nossos ancestrais e as sociedades compostas por indivíduos caçadores e coletores apresentavam baixa incidência de doenças como as cardiovasculares e algumas neoplasias, embora esse fato seja questionado devido às dificuldades de pesquisas nesse campo.

¹**Sobrepeso e Obesidade:** Índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 25kg/m²; IMC igual ou superior a 30kg/m², respectivamente; **Índice de adiposidade:** Representa o conteúdo de gordura total dentro da massa corporal total e, distingue-se do sobrepeso e obesidade.

Durante o período Paleolítico, nossos ancestrais alimentavam-se basicamente da caça, da pesca e da coleta de vegetais, os alimentos crus não podiam ser escolhidos ou conservados. Então, diariamente o gasto calórico e o nível de atividade física era alto em função da busca por água e alimentos, da atividade migratória e nômade, da procura por regiões com alimentos disponíveis, além da fuga de predadores e da luta pela sobrevivência (CORDAIN et al., 2005; O'KEEFE et al., 2010).

Em determinado período da evolução, acredita-se que, o convívio social e o desenvolvimento cognitivo advindo dessas relações representaram pressões evolutivas que contribuíram para a expansão do cérebro/córtex humano. Embora alguns cientistas acreditem que a expansão tenha ocorrido em função do desenvolvimento cognitivo, outros acreditam que as alterações no padrão de alimentação é que propiciaram a expansão do córtex pré-frontal e o desenvolvimento cognitivo (CUNNANE, 2010).

A despeito dessa divergência, o desenvolvimento rápido do cérebro de nossos ancestrais contribuiu para um elevado gasto calórico diário (25% do total) além do desenvolvimento dos aspectos cognitivos, habilidades estas que nos tornam especiais e nos diferem de outros primatas. Segundo Herculano-Houzel et al, 2010, o grande marco que favoreceu o desenvolvimento do neocórtex e fomentou toda energia necessária para os processos cognitivos, foi o advento da cocção, ou seja a pré-digestão dos alimentos e a maior extração de calorias do alimentos consumidos.

Se por um lado o advento da cocção e o desenvolvimento cognitivo propiciou o aumento do gasto calórico pelo cérebro, a sociedade sofreu drásticas e rápidas mudanças dentre as quais podemos destacar a revolução agrícola, industrial e tecnológica. Essas revoluções propiciaram, além de mudanças no cenário econômico e tecnológico, intenso remodelamento e alteração no estilo de vida. O desenvolvimento industrial propiciou aumento na produção e consumo de alimentos industrializados com alto conteúdo calórico e gordura saturada, ricos em agrotóxicos e conservantes, gordura *trans* e alimentos com alto índice glicêmico. Além da importante diminuição de ácidos graxos poli-insaturados Omega 3 e o aumento do consumo de Omega 6.

Portanto, a mudança do perfil nutricional aliado a alta disponibilidade de alimentos e a diminuição do nível de atividade física diária, podem ter contribuído de sobremaneira para o desenvolvimento e aumento de diferentes doenças, dentre as

quais, as afeções prostáticas e as interações com os fatores nutricionais são de interesse do presente trabalho.

Anatomia da próstata

A próstata é uma glândula acessória túbulo-alveolar do sistema reprodutor masculino, localizada ao redor da uretra, abaixo da bexiga e em frente ao reto, composta de ductos e alvéolos com atividade secretora. Dentre as funções desse tecido glandular, destaca-se a produção e secreção de importantes nutrientes e elementos que compõem o líquido seminal (HAYWARD; CUNHA, 2000; WILHELM; KOOPMAN, 2006). Íons, citrato, zinco, frutose, lipídeos, enzimas proteolíticas, substâncias anti-inflamatórias e imunossupressoras são alguns dos componentes do líquido seminal produzidos pela próstata que propiciam a nutrição, a motilidade e a sobrevivência do espermatozoide na vagina, assegurando a fecundação e consequentemente a sobrevivência e reprodução da espécie (TAYLOR; RISBRIDGER, 2008; UNTERGASSER; MADERSBACHER; BERGER, 2005).

Embora a função da glândula prostática seja conservada entre mamíferos, existem diferenças anatômicas e histológicas entre as espécies (TIMMS, 2008). Em humanos, a próstata apresenta-se como uma estrutura túbulo-alveolar composta de ductos e alvéolos organizados de forma complexa e com atividade secretora associada principalmente a região alveolar. Historicamente, apesar de ser dividida previamente em lóbulos, devido a alta complexidade das ramificações ductais e alveolares (MCNEAL; COMPANY, 1983; MCNEAL, 1981), a classificação mais atual proposta por (TIMMS, 2008) divide a glândula de humanos virtualmente em quatro zonas sem distinção de lobos: zonas central, de transição, periférica e estroma fibromuscular anterior (**Figura 1**).

Em roedores, a próstata apresenta-se como uma glândula túbulo-alveolar, multilobular, situada ao redor da uretra e na base da bexiga, formada por um sistema complexo de ductos que tem origem na base da uretra e se projetam distalmente em ramos bem definidos. Dessa forma, ao contrário da próstata de humanos é possível identificar quatro lobos distintos conforme sua posição anatômica: próstata ventral (PV), próstata anterior (PA), próstata dorsal (PD) e lateral (PD) (TIMMS, 2008).

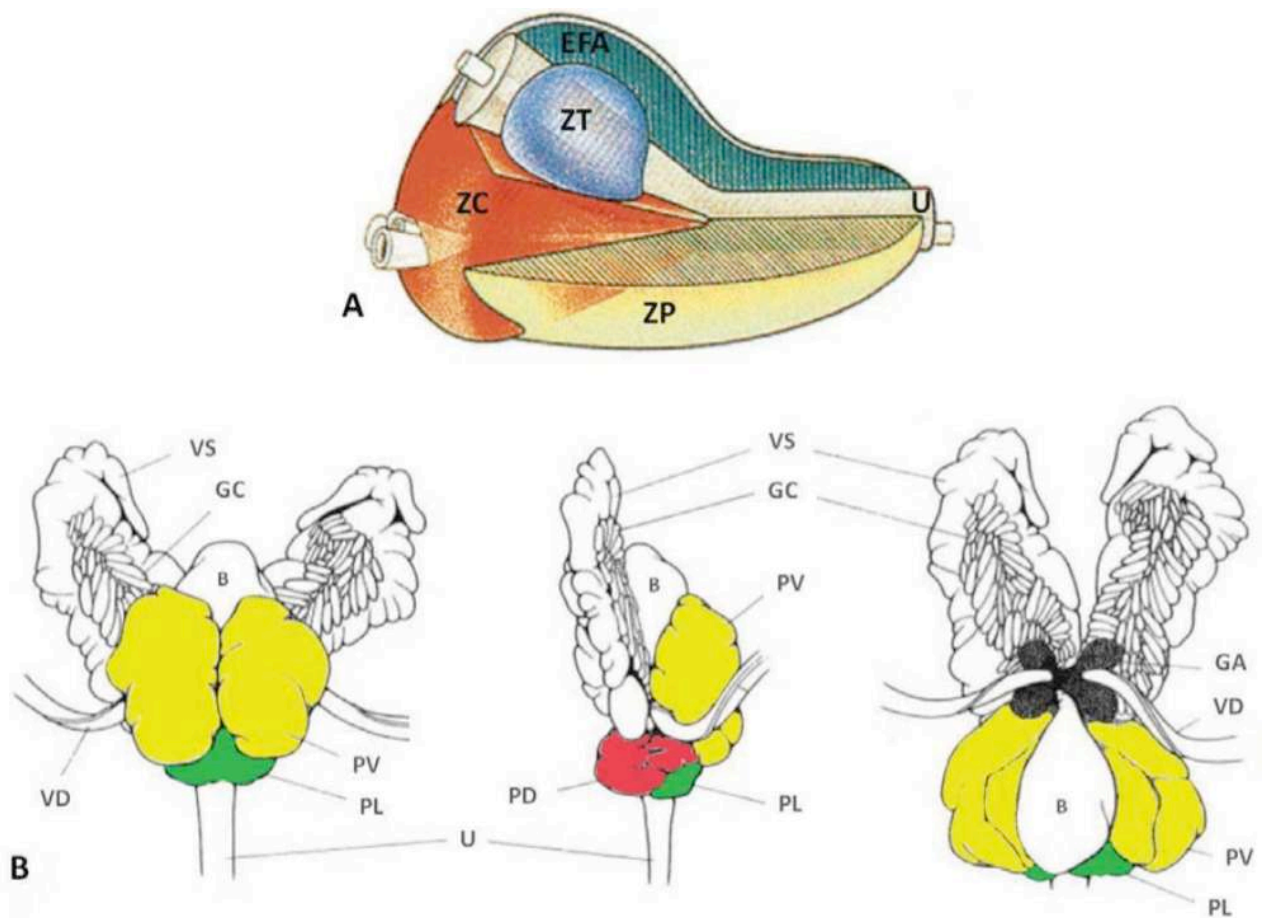


Figura 1. (A) Representação da próstata masculina humana e sua divisão em zonas. U (Uretra), ZT (zona de transição), ZC (zona central), ZP (zona periférica), EFA (estroma fibromuscular anterior). **(B)** Representação do complexo prostático de roedores machos adultos mostrando a divisão da próstata em lobos e sua distribuição anatômica. U (uretra), B (bexiga), VS (vesícula seminal), VD (vaso deferente); PV (próstata ventral; em amarelo), PL (próstata lateral; em verde), PD (próstata dorsal; em vermelho), GC (glândula coaguladora), GA (glândula ampular). Figura adaptada de (TIMMS, 2008)

Aspectos histológicos e morfofisiológicos da próstata

A arquitetura tecidual da próstata de mamíferos é caracterizada por três compartimentos diferentes altamente organizados, o epitélio, o estroma e o lúmen. O epitélio é formado por células epiteliais secretoras, basais, intermediárias e neuroendócrinas e, pode variar de epitélio simples cuboide ou cilíndrico à pseudo-estratificado (DE MARZO et al., 1998; MCNEAL; COMPANY, 1983). Marcadores

específicos diferenciam as células epiteliais, sendo que as epiteliais luminais expressam citoqueratina 8 (Ck8), citoqueratina 18 (Ck18), receptor de andrógeno (AR) e, em humanos expressa também o antígeno prostático (PSA). As células basais expressam Cks 5 e 14, Bcl-2 e p63. As células neuroendócrinas, estão dispersas entre as camadas de células basais e luminais. São consideradas populações totalmente diferenciadas e sem capacidade proliferativa.

O epitélio prostático e o compartimento estromal são separados por uma lâmina basal organizada, composta por laminina e colágeno tipo IV. O estroma localiza-se entre as estruturas glandulares, sendo composto por fibroblastos, células musculares lisas, células do sistema imune, nervos, vasos, componentes fibrilares (colágenos e fibras elásticas) e não-fibrilares (proteoglicanos, glicoproteínas, água e outros elementos de matriz extracelular). O lúmen é o compartimento responsável por armazenar as secreções produzidas e secretadas pelas células epiteliais secretoras (CUNHA et al., 2004; HAYWARD; CUNHA, 2000; HAYWARD et al., 1998).

Em roedores, os diferentes lóbulos (PV, PL, PD e PA) exibem formas distintas devido ao padrão diferenciado e único de ramificação e de características histológicas particulares a cada lobo. Cada lobo apresenta um conjunto de ductos que se originam na uretra em forma de estrutura tubular simples e se projetam distalmente em estrutura ramificada. O conjunto de ductos é dividido em regiões com morfologia e função distintas quanto ao conjunto de proteínas secretadas e, são classificadas de acordo com sua posição em relação a uretra em região próxima, medial e distal (LEE et al., 1990; MCNEAL; COMPANY, 1983).

A região distal, caracteriza-se por células epiteliais colunares altas com alta atividade proliferativa, circundadas por células musculares lisas organizadas em uma camada espessa e descontínua. Células colunares altas também são encontradas na região intermediária, porém essas apresentam baixa capacidade proliferativa e alta atividade secretora. As células musculares lisas nessa região organizam-se em uma camada fina e contínua. Por último na região proximal, as células epiteliais são baixas e cúbicas e as células musculares lisas formam uma camada espessa (MCNEAL; COMPANY, 1983; NEMETH; LEE, 1996).

A próstata de gerbilos é bastante semelhante àquelas de ratos e camundongos, na sua organização anatômica e histológica. Ao contrário destes, entretanto, apresenta alta sensibilidade a diferentes tipos de estresse, como

variações hormonais, disruptores endócrinos e carcinógenos. Um aspecto distinto, e que torna este modelo particularmente interessante, do ponto de vista da abordagem deste trabalho, refere-se ao metabolismo de lipídios que é aumentado por ser a fonte de água metabólica, importante nos animais que não ingerem água, habitantes de ambientes desérticos e que se alimentam de dietas ricas em gorduras (Garrett Grisham 2010).

Organogênese Prostática

Embora existam diferenças anatômicas, morfológicas e na atividade secretora da próstata entre as espécies, a organogênese preserva diversas semelhanças entre mamíferos. Tanto em humanos como roedores o processo tem início ainda na vida fetal ou embrionária e término entre o nascimento e a puberdade ou maturidade sexual (CUNHA et al., 2004; MARKER et al., 2003). Em humanos o desenvolvimento ocorre no segundo e terceiro trimestre de gestação e encontra-se completo no nascimento, já em roedores a maior parte do desenvolvimento ocorre nos 15 dias iniciais da vida neonatal. (POWERS; MARKER, 2013; PRINS; PUTZ, 2008).

O desenvolvimento prostático é um processo complexo, altamente coordenado e dependente da produção de hormônios esteroides, de vias de sinalização e interações parácrinas e autócrinas entre o epitélio e o estroma, além da ação de fatores autônomos secretados pelas células. Esse processo pode ser didaticamente dividido em cinco etapas; diferenciação sexual e determinação do órgão, indução e brotamento epitelial, morfogênese de ramificação, diferenciação e maturação celular. O início do processo ocorre com alterações morfológicas e moleculares no seio urogenital (UGS). (MARKER et al., 2003; PRINS; PUTZ, 2008).

O UGS é uma estrutura de origem endodérmica derivada da cloaca (região caudal do intestino grosso) formado por uma porção mesenquimal (UGM) e uma porção epitelial (UGE). Essa estrutura em roedores encontra-se indiferenciada tanto no sexo masculino como no feminino até o 13º dia pós concepção (dpc) e até a 7ª semana de gestação em humanos. A formação das gônadas e a secreção de hormônios androgênicos são eventos determinantes e de suma importância para indução prostática e formação dos primeiros brotos a partir do UGS (MARKER et al., 2003; WILHELM; KOOPMAN, 2006).

Em camundongos a formação das gônadas tem início com a formação das cristas genitais por volta do 10° dpc e, a despeito do início da atividade de programas gênicos que determinam a bifurcação entre a formação das gônadas masculinas ou femininas por volta do 10.5° dpc, as cristas genitais permanecem morfológicamente indiferenciados até o 12° dpc.

A manutenção do estado indiferenciado das cristas genitais depende de um fino controle entre genes e fatores de transcrição específicos e, qualquer alteração nessa programação gênica pode gerar má formação das gônadas e da genitália. Em camundongos a expressão transiente do gene *Sry*, presente no cromossomo Y, entre o 10.5° e 12.5° dpc e a indução da expressão de *Sox9*, são eventos chaves para a diferenciação das células Sertoli a partir do sulco urogenital, desencadeando a formação de cordões testiculares, a diferenciação de células germinativas em espermatogônias e a completa formação dos testículos por volta do 13° dia do desenvolvimento embrionário (13° dpc), consequentemente na **diferenciação do sexo** masculino ou feminino (MARKER et al., 2003; WILHELM; KOOPMAN, 2006).

Após a diferenciação sexual e a diferenciação das gônadas, o aumento da produção da testosterona pelos testículos fetais no 13° dpc favorece a **indução prostática** e a formação dos primeiros brotos epiteliais entre o 16.5° e 17.5° dia do desenvolvimento embrionário. O mesênquima do seio urogenital, formado por três regiões distintas dentre as quais destaca-se o mesênquima periuretral e o pé mesenquimal ventral (VMP) mostra-se responsivo a presença do estímulo androgênico e induz a formação dos primeiros brotos. Segundo a literatura o VMP, estrutura que origina o estroma prostático, é a região da UGM responsável pelo mecanismos intrínsecos ao processo de indução, porém o processo e a participação do UGM como um todo não é totalmente compreendido e a participação de outras regiões não podem ser descartadas.

Hoje, o estado da arte preconiza que as células do VMP expressam receptores androgênicos (AR) e ativação desses receptores por testosterona desencadeia a produção de moléculas mediadoras conhecidas como andromedinas, que exibem ação parácrina nas células epiteliais que compõem o UGE. Embora a literatura relate a expressão de AR também no epitélio do UGS, a indução é um fenômeno condicionado as interações epitélio-mesenquimais e independente da expressão de AR na UGE (POWERS; MARKER, 2013).

Após a fase de indução ou brotamento epitelial, o desenvolvimento da

próstata ocorre até o 21º dia pós natal (POWERS; MARKER, 2013; VILAMAIOR; TABOGA; CARVALHO, 2006), período esse caracterizado pelo crescimento epitelial a partir de um cordão compacto de células, diferenciação das células luminais, basais e neuroendócrinas (KARTHAUS et al., 2014; OUSSET et al., 2012); alargamento do lúmen mediado por morte celular e secreção polarizada (BRUNICARDOSO; CARVALHO, 2007); ramificação das estruturas epiteliais e diferenciação das células mesênquimais em células musculares lisas resultando nessa glândula epitelial com característica túbulo-alveolar ramificada (DONJACOUR; THOMSON; CUNHA, 2003; SUGIMURA; CUNHA; DONJACOUR, 1986).

Ácido graxos Poliinsaturados

Há décadas sabe-se que os ácidos graxos e lipídeos, são utilizados como substrato para gerar energia em diferentes processos metabólicos. São estocados na forma de gordura provendo energia para diferentes atividades, processos biológicos e em períodos de escassez de alimentos, além participarem da composição estrutural de diferentes tecidos biológicos.

Nos últimos anos, estudos têm elucidado a importância dos lipídeos, ácidos graxos e metabólitos secundários derivados do metabolismo lipídico em diferentes processos biológicos e funções celulares, como a regulação da expressão gênica, a sinalização celular e termogênese corporal (HWANG, 2001).

Os lipídios podem ser basicamente divididos em saturados, monoinsaturados e poliinsaturados quanto ao grau de saturação ou insaturações das moléculas. Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) são moléculas que apresentam duas ou mais insaturações em sua estrutura.

Os ácidos graxos poliinsaturados das famílias n-3 e n-6, conhecidos também como Ômega 3 (ω 3) e Ômega 6 (ω 6) têm recebido grande parte da atenção da comunidade científica interessada em investigar os mecanismos moleculares desencadeados por ácidos graxos e lipídeos que podem prevenir ou propiciar o desenvolvimento e progressão de diferentes doenças.

Os AGPIs podem ser classificados quando ao número de insaturações (duplas ligações) encontradas principalmente na posição cis das cadeias carbônicas, ou ainda, quanto a localização da primeira dupla ligação na cadeia, considerando o carbono do grupamento metila como carbono ω (Ômega), essa nomenclatura da

origem aos ácidos graxos que compõem às famílias $\omega 3$, $\omega 6$, $\omega 7$ e $\omega 9$. Sendo as duas primeiras as mais abordadas em estudos científicos.

Dentre os ácidos graxos pertencentes à família dos $\omega 6$, destaca-se o ácido linoléico (LA – 18:2-n6) e o seu derivado o ácido araquidônico (AA – 20:4-n6). Já entre a família dos $\omega 3$ destacam-se o ácido α -linolênico (ALA – 18:3-n3) e seus derivados os ácidos graxos docosahexanóico (DHA – 22:6-n3) e ácido eicosapentanóico (EPA – 20:5-n3). Os ácidos graxos linolênico e α -linolênico são considerados ácidos graxos essenciais pois não podem ser sintetizados pelo organismo, devido a ausência da enzima delta 9-dessaturase e, devem portanto ser obtidos através da dieta.

As principais fontes alimentares de ALA são legumes, vegetais, nozes, chia e os óleos vegetais como o de canola e especial o linhaça, foco e objeto desse estudo (KUIPERS; JOORDENS; MUSKIET, 2012). Já o DHA e o EPA, derivados do ALA, são obtidos por meio do consumo de peixes de águas frias, como atum, cavala, salmão, peixe espada, arenque, sardinhas e bacalhau. Entretanto o conteúdo e qualidade dessa gordura varia entre as espécies de acordo com a região de criação, variáveis ambientais como criação em cativeiro e o consumo alimentar. Embora o ALA possa ser convertido em DHA e EPA por uma série de reações de dessaturação e alongamento, em tecidos como fígado, gônadas, cérebro e tecido adiposo, a magnitude e velocidade dessa conversão é limitada e permanece controversa (HAAG, 2003; TAMMA et al., 2015), portanto a alimentação é fonte importante desses ácido graxos.

O LA, principal representante da família dos $\omega 6$, pode ser encontrado principalmente em óleos vegetais, como o óleo de soja, milho e girassol ou ainda em oleaginosas como castanhas e nozes (RUSSO, 2009). Os ácido graxos monoinsaturados apresentam apenas uma dupla ligação e pertencem a família $\omega 9$ e $\omega 7$. O ácido oleico, principal representante da família do $\omega 9$ é encontrado principalmente no óleo de soja, enquanto o ácido palmitoleico, principal representante da família do $\omega 7$ é encontrado no óleo de macadâmia (GARG; BLAKE; WILLS, 2003; GRIEL et al., 2008).

Os ácidos graxos poliinsaturados das famílias n-3 e n-6 são compostos essenciais para manutenção da fisiologia humana, pois desempenham importantes funções em diferentes níveis biológicos, são componentes integrais das membranas e conferem a fluidez e flexibilidade à membrana, dessa maneira podem influenciar o

transporte de substâncias do meio intracelular para o extracelular e do meio extracelular para meio intracelular, além de modular a sinalização celular através dos *Lipid Rafts* (HWANG, 2001; TAMMA et al., 2015).

Embora os Ômega 3 e 6 participem da manutenção do equilíbrio celular, estudos sugerem que o baixo consumo ou o consumo excessivo de ácido graxos poliinsaturados pode favorecer o desenvolvimento de diferentes doenças, principalmente aquelas relacionados ao processo inflamatório. O desenvolvimento de doenças associadas a próstata tem os ácidos graxos e lipídios como importantes fatores nutricionais associados a etiopatogenia das doenças prostáticas.

O perfil lipídico dietético modula o desenvolvimento e a incidência de doenças associadas a próstata?

A hiperplasia benigna prostática (BHP) e o câncer de próstata (CP) estão entre as doenças que mais acometem a glândula prostática. Apesar de apresentarem traços semelhantes como a dependência de andrógenos e fatores de riscos como a inflamação e distúrbios metabólicos, exibem características histológicas distintas e a relação e progressão entre as duas doenças ainda é questionada e controversa (CHANG; KIRBY; CHALLACOMBE, 2012; ØRSTED; BOJESEN, 2013). Segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer) e a Sociedade Americana de Câncer, entre 2014 e 2016, os novos casos de câncer de próstata corresponderão a aproximadamente 27% de todos os novos casos de câncer no Brasil e nos EUA. Embora nos EUA o CP apresente incidência menor do que o câncer de pulmão, no Brasil apresenta a mais alta taxa de incidência e mortalidade entre todos tipos de câncer no sexo masculino, com exceção do melanoma (ATTARD et al., 2015; FERLAY et al., 2014).

Os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento do BHP e do CP não foram completamente elucidados e, embora se saiba que o processo é multifatorial e influenciado por diferentes fatores de riscos como os fatores hormonais, hereditários, genéticos (SANDA et al., 1994), étnicos (KHEIRANDISH; CHINEGWUNDOH, 2011) e nutricionais (BRAVI et al., 2006), a etiopatogenia do câncer de próstata permanece como ponto fundamental de investigação. Diferentes estudos apontam a prevalência (de 6 a 50 vezes) do câncer de próstata em países ocidentais e em populações de imigrantes para estas regiões, reforçando a importância do ambiente e de fatores relacionados ao estilo de vida no desenvolvimento da doença (LABBÉ et al., 2014;

LEE et al., 1990, 2007; SHIMIZU et al., 1991). A obesidade correlaciona-se ao aumento da incidência e da agressividade do câncer de próstata e, o consumo total de ácidos graxos dietéticos são apontados como um dos principais fatores etiológicos no desenvolvimento da BHP e do adenocarcinoma prostático (EPSTEIN et al., 2012). Dessa forma, o interesse pelo papel dos ácidos graxos nos mecanismos e no desenvolvimento das doenças relacionadas à próstata tem aumentado e, os estudos em animais experimentais têm demonstrando que o consumo de dietas ricas em ácidos graxos saturados promove enquanto uma redução no consumo ou no conteúdo total de ácidos graxos da dieta retarda o crescimento da próstata (CHO et al., 2015). Aparentemente, a quantidade de ácidos graxos na dieta ocidental, a obesidade (acúmulo de gordura corporal) e o risco do câncer de próstata estão intimamente associados. Entretanto, as evidências para estas associações em humanos são menos consistentes e não demonstram clara associação entre a quantidade de ácidos graxos consumidos e o risco de câncer de próstata. Um fator importante no esclarecimento das interações entre estes três fatores é a qualidade (perfil) dos ácidos graxos existentes nas dietas (OHWAKI et al., 2012).

Os benefícios dos ácidos graxos poliinsaturados foram demonstrados em diferentes estudos ao longo dos anos e foram relacionados principalmente ao efeito cardioprotetor, à modulação da atividade de células e componentes do sistema imune, e a prevenção da aterosclerose (CHIVA-BLANCH; BADIMON; ESTRUCH, 2014; ESTRUCH et al., 2013; PARKS; RUDEL, 1990). Mais recentemente, os ácidos graxos poliinsaturados foram apontados como agentes terapêuticos potenciais na reversão da perda de neurônios relacionados ao controle da ingesta alimentar e gasto energético em modelo experimental de obesidade, por meio do aumento da neurogênese hipotalâmica (NASCIMENTO et al., 2015). Entretanto, o consumo de dietas com alto conteúdo de Ômega 6 tem sido associado ao aumento do risco de câncer de próstata, através da produção de eicosanoides da série par, como leucotrienos, prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, mediadores esses pró-inflamatórios derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA-20:4) incorporado à membrana celular. Além de contribuir para a intensificação da resposta inflamatória, o ácido araquidônico estimula a proliferação celular (BERQUIN et al., 2011). Por outro lado, estudos *in vitro* e em animais sugerem que ácidos graxos poliinsaturados ricos em Ômega 3, em especial o α -linolênico (LA -

18:2) e seus derivados docosahexanóico (DHA - 22:6) e ácido eicosapentaenóico (EPA - 20:5), têm efeitos anti-inflamatórios, pró-apoptóticos, anti-angiogênicos e anti-proliferativos (GU et al., 2013; SPENCER et al., 2009). Estes estão portanto, inversamente correlacionados com a incidência de BHP e CP. Contudo, nem todos os estudos apontam na mesma direção (BRASKY et al., 2013). Em humanos, altos níveis plasmáticos de ácido docosapentaenóico (DPA – 22:5) correlacionam-se com menor risco de CP, já os níveis de EPA/DHA estão associados positivamente com o aumento do risco de câncer de próstata (CHUA et al., 2013). A complexidade dos efeitos dos ácidos graxos sobre diferentes tipos celulares, órgãos e a susceptibilidade à doenças, se dá pelo fato de poderem atuar como substratos energéticos, como elementos plásticos para a biossíntese de membranas, como substratos de diferentes enzimas e, desta forma, contribuírem para a formação de diversas moléculas bioativas, inclusive aquelas com função pró- ou anti-inflamatórias (ZADRA; PHOTOPOULOS; LODA, 2013), como mencionado acima. Além disto, a gordura corporal pode ter efeitos indiretos na progressão tumoral, dada a expressão de receptores para adipocinas, como o receptor 2 da Adiponectina pelas células normais e tumorais prostáticas (RIDER et al., 2015).

O mais provável é que ácidos graxos diferentes possuam papéis distintos em diferentes estágios da doença, uma vez que os tumores localizados dependentes de andrógenos, os tumores localizados em estágios avançados e o câncer de próstata resistente à castração (resultante da terapia hormonal) apresentam características bastante diferentes. Considerando que o diagnóstico do câncer de próstata se dá geralmente em idades avançadas e que fatores ambientais são particularmente importantes na incidência do CP, temos interesse em identificar fatores que promovam alterações na fisiologia prostática da puberdade a idade adulta e, que possam afetar a susceptibilidade à carcinogênese, ou seja, favoreçam a ocorrência das modificações iniciais que permitirão a progressão tumoral. Embora manifestações clínicas e alterações na fisiologia prostática não são observadas até a idade adulta, sugere-se que as alterações patológicas podem ser pré-condicionadas ainda no período fetal ou da organogênese prostática (Bateson et al., 2004).

IV. HIPÓTESE

O desenvolvimento, as alterações e as afecções associadas à próstata têm como importante fator de risco, os hábitos alimentares e a nutrição. A exposição à dieta ocidental, rica em gordura saturada, alto conteúdo calórico e baixo teor de ácidos graxos poliinsaturados parece contribuir para a promoção de diferentes doenças associadas a essa glândula, além de incluir consumo de óleo de soja. Esses temas são controversos e faltam evidências inequívocas que atribuam relações causais a esses fatores. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a qualidade dos ácidos graxos presentes na dieta influencia o crescimento prostático, aumenta a taxa de proliferação epitelial e aumenta o conteúdo de receptores de andrógeno e do PPAR γ (ESCOBAR; GOMES-MARCONDES; CARVALHO, 2009). Estes resultados permitiram o estabelecimento de associação entre o percentual de ácidos graxos insaturados/ácido graxo saturado na dieta e fenótipos glandulares que poderiam modular a propensão a neoplasias epiteliais. Entretanto, este estudo foi restrito a uma espécie (ratos) e a curta exposição.

Nesse trabalho, procuramos testar a hipótese de que o tempo de exposição e a qualidade (perfil) dos ácidos graxos presentes na dieta afetam o metabolismo sistêmico, a estrutura e fisiologia da próstata, definindo a susceptibilidade do órgão a diferentes afecções, incluindo o câncer de próstata em diferentes espécies.

V. OBJETIVO GERAL

Identificar alterações metabólicas sistêmicas e da próstata causadas pela exposição ao modelo de dietas normolipídicas baseadas em banha de porco, óleo de soja e óleo de linhaça que indiquem a propensão a ou existência de afecções/lesões típicas do órgão.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar se os resultados previamente obtidos para ratos pela exposição a dietas normolipídicas (7%) com ácidos graxos de diferentes qualidades (ESCOBAR; GOMES-MARCONDES; CARVALHO, 2009) são reproduzidos em duas outras espécies: camundongos (linhagem C57/BL6) e Gerbilos da Mongólia.
2. Estender para 32 semanas o tempo de exposição de camundongos C57/BL6 às diferentes dietas;
3. Definir parâmetros biométricos (incluindo esteatose hepática) e metabólicos sistêmicos (respirometria, termogênese facultativa induzida pelo frio, teste de tolerância a glicose e a insulina) de camundongos C57/BL6 nas diferentes condições experimentais (dietas e tempo);
4. Caracterizar as alterações estruturais (histologia, estereologia e morfometria) e o transcriptoma (RNAseq) da próstata ventral de camundongos C57/BL6 nas diferentes condições experimentais;

Dietary fatty acid quality promotes stereotypic organismal and prostate gland changes including prostatitis, epithelial hyperplasia and pre-neoplastic lesions

Artigo: Ácidos graxos presentes na dieta causam diferentes alterações sistêmicas e da glândula prostática que incluem prostatites, hiperplasia epitelial e lesões pré-neoplásicas

¹ Danilo L. Ferrucci (daniloferrucci@gmail.com)

² André S. Viera (vieira.as@gmail.com),

² Iscia T.L. Cendes (icendes@unicamp.br)

¹ Hernandes F. Carvalho (hern@unicamp.br)

¹ Department of Structural and Functional Biology, University of Campinas, Brazil

² School of Medical Sciences, Department of Medical Genetics, University of Campinas, Brazil

Corresponding author: Hernandes F. Carvalho; Dept. Structural and Functional Biology, State University of Campinas, 13084-970, Campinas SP, Brazil.

e-mail hern@unicamp.br

ABSTRACT

Environmental and nutritional factors are associated to prostatitis etiology, benign prostate hyperplasia and prostate cancer. General lipids and in particular fatty acids are important dietary agents in these diseases. In the current work, we hypothesized that different dietary fatty acids profiles even in normolipidic diets (7%), modulate the prostatic growth and physiology, generating differential gene expression patterns, resulting in increased susceptibility and/or incidence of prostate disorders. In this way, we fed male C57/BL6 mice with normolipidic diets based on linseed oil, soybean oil or lard [(which have difference on content of saturated and unsaturated fatty acid and ratio ω -3 / ω -6 (ω ratio))] by 12 and 32 weeks after weaning, and conducted a comprehensive analysis of structural and functional parameters of prostate gland inserting it in a systemic metabolic context. Additional analyzes were performed in male Mongolian gerbil, because it presents metabolic deviation and low water consumption (i.e it depends on fatty acids oxidation for production of metabolic water). Linseed oil based diet (67.4% of polyunsaturated fatty acids, ω -ratio = 3.70) resulted predominantly in a thermogenic metabolic profile, while a soybean oil-based diet (52.7% of polyunsaturated fatty acids, ω -ratio = 0.11) increased body growth and fatness. Mice fed on lard-based diet (13.1% of polyunsaturated fatty acids, ω -ratio = 0.07) promotes a biphasic profile of growth, initially stimulating weight gain, but resulting in decrease of adiposity and body weight growth in adult male mice. Contrary to the linseed oil-based diet, soy and lard based-diet resulted also in hepatic steatosis and steatohepatitis, respectively . Lard and soybean-based diet increased prostate growth and the prostatic epithelial volume, and lard resulted in a prostate growth associated with epithelial hyperplasia as well. Differentially, linseed oil-based diet group presented reduction of prostate growth and atrophic epithelium. Inflammatory cells were frequently present in lard (predominantly stromal) and linseed oil-based diet (luminal predominantly). Interestingly, these groups with increased inflammatory cells (32 weeks of diet), showed enriched inflammation ontologies revealed with RNAseq analyzes performed at 12 weeks. After 32 weeks of exposure to diets based on linseed and lard, the transcriptome revealed ontologies related to endoplasmic reticulum stress. In conclusion, different fatty acids profiles at normolipidic diets affect stereotypically several systemic and prostatic aspects,

resulting in atrophy or epithelial hyperplasia associated or non to non-infectious prostatitis, whose combinations could increase the predisposition to carcinogenesis.

Palavras chaves : Prostate, diet, fatty acids, transcriptome, growth.

INTRODUÇÃO

A Hiperplasia Benigna Prostática (BHP) e o câncer de Próstata (CP) estão entre as doenças que mais acometem a glândula prostática. Apesar de apresentarem traços semelhantes como a dependência de andrógenos e fatores de riscos como a inflamação e distúrbios metabólicos, exibem características histológicas distintas e a relação e progressão entre as duas doenças ainda é questionada e controversa (CHANG; KIRBY; CHALLACOMBE, 2012; ØRSTED; BOJESSEN, 2013). Segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer) e a Sociedade Americana de Câncer, entre 2014 e 2016, os novos casos de câncer de próstata corresponderão a aproximadamente 27% de todos os novos casos de câncer no Brasil e nos EUA. Embora nos EUA o CP apresente incidência menor do que o câncer de pulmão, no Brasil apresenta a mais alta taxa de incidência e mortalidade entre todos tipos de câncer no sexo masculino, com exceção do melanoma (ATTARD et al., 2015; FERLAY et al., 2014).

Os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento do BHP e do CP não foram completamente elucidados e, embora se saiba que o processo é multifatorial e influenciado por diferentes fatores de riscos como os fatores hormonais, hereditários, genéticos (SANDA et al., 1994), étnicos (KHEIRANDISH; CHINEGWUNDOH, 2011) e nutricionais (BRAVI et al., 2006), a etiopatogenia do câncer de próstata permanece como ponto fundamental de investigação. Diferentes estudos apontam a prevalência (de 6 a 50 vezes) do câncer de próstata em países ocidentais e em populações de imigrantes para estas regiões, reforçando a importância do ambiente e de fatores relacionados ao estilo de vida no desenvolvimento da doença (LABBÉ et al., 2014; LEE et al., 1990, 2007; SHIMIZU et al., 1991). A obesidade correlaciona-se ao aumento da incidência e da agressividade do câncer de próstata e, o consumo total de ácidos graxos dietéticos são apontados como um dos principais fatores etiológicos no desenvolvimento da BHP e do adenocarcinoma prostático (EPSTEIN et al., 2012). Dessa forma, o interesse pelo papel dos ácidos graxos nos mecanismos e no desenvolvimento das doenças relacionadas à próstata tem aumentado e os estudos em animais experimentais têm demonstrando que o consumo de dietas ricas em ácidos graxos saturados promove enquanto uma redução no conteúdo total de ácidos graxos retarda o crescimento da próstata (CHO et al., 2015). Aparentemente, a quantidade de ácidos graxos na dieta ocidental, a

obesidade (acúmulo de gordura corporal) e o risco do câncer de próstata estão intimamente associados. Entretanto, as evidências para estas associações em humanos são menos consistentes e não demonstram clara associação entre a quantidade de ácidos graxos consumidos e o risco de câncer de próstata. Um fator importante no esclarecimento das interações entre estes três fatores é a qualidade (perfil) dos ácidos graxos existentes nas dietas (OHWAKI et al., 2012).

Os benefícios dos ácidos graxos poliinsaturados foram demonstrados em diferentes estudos ao longo dos anos e foram relacionados principalmente ao efeito cardioprotetor, à modulação da atividade de células e componentes do sistema imune, e a prevenção da aterosclerose (CHIVA-BLANCH; BADIMON; ESTRUCH, 2014; ESTRUCH et al., 2013; PARKS; RUDEL, 1990). Mais recentemente, os ácidos graxos poliinsaturados foram apontados como agentes terapêuticos potenciais na reversão da perda de neurônios relacionados ao controle da ingesta alimentar e gasto energético em modelo experimental de obesidade, através do aumento da neurogênese hipotalâmica (NASCIMENTO et al., 2015). Entretanto, o consumo de dietas com alto conteúdo de Ômega 6 tem sido associado ao aumento do risco de câncer de próstata, através da produção de eicosanoides da série par, como leucotrienos, prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, mediadores esses pró-inflamatórios derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA-20:4) incorporado à membrana celular. Além de contribuir para a intensificação da resposta inflamatória, o ácido araquidônico estimula a proliferação celular (BERQUIN et al., 2011). Por outro lado, estudos *in vitro* e em animais sugerem que ácidos graxos poliinsaturados ricos em Ômega 3, em especial o α -linolênico (LA - 18:2) e seus derivados docosahexanóico (DHA - 22:6) e ácido eicosapentaenóico (EPA - 20:5), têm efeitos anti-inflamatórios, pró-apoptóticos, anti-angiogênicos e anti-proliferativos (GU et al., 2013; SPENCER et al., 2009). Estes estão portanto, inversamente correlacionados com a incidência de BHP e CP. Contudo, nem todos os estudos apontam na mesma direção (BRASKY et al., 2013). Em humanos, altos níveis plasmáticos de ácido docosapentaenóico (DPA – 22:5) correlacionam-se com menor risco de CP, já os níveis de EPA/DHA estão associados positivamente com o aumento do risco de câncer de próstata (CHUA et al., 2013). A complexidade dos efeitos dos ácidos graxos sobre diferentes tipos celulares, órgãos e a susceptibilidades a doenças, se dá pelo fato de poderem atuar substratos como energéticos, como elementos plásticos para a biossíntese de membranas, como

substratos de diferentes enzimas e, desta forma, contribuírem para a formação de diversas moléculas bioativas, inclusive aquelas com função pró- ou anti-inflamatórias (ZADRA; PHOTOPOULOS; LODA, 2013), como mencionado acima. Além disto, a gordura corporal pode ter efeitos indiretos na progressão tumoral, dada por exemplo a expressão de receptores para adipocinas, como o receptor 2 da adiponectina pelas células normais e tumorais prostáticas (RIDER et al., 2015).

O mais provável é que ácidos graxos diferentes possuam papéis distintos em diferentes estágios da doença, uma vez que os tumores localizados dependentes de andrógenos, os tumores localizados em estágios avançados e o câncer de próstata resistente à castração (resultante da terapia hormonal) apresentam características bastante diferentes.

Considerando que o diagnóstico do câncer de próstata se dá geralmente em idades avançadas e que fatores ambientais são particularmente importantes na incidência do CP, temos interesse em identificar fatores que promovam alterações na fisiologia prostática e que possam afetar a susceptibilidade à carcinogênese, ou seja, favoreçam a ocorrência das modificações iniciais que permitirão a progressão tumoral.

Em artigo recente (ESCOBAR; GOMES-MARCONDES; CARVALHO, 2009), demonstramos que os perfis de ácidos graxos presentes na dieta normolipídica afetam a taxa de proliferação epitelial e o crescimento geral da próstata ventral de ratos, em paralelo a variações nos níveis circulantes de testosterona e de estrógeno, e na expressão do receptor de andrógeno e de PPAR γ pelas células epiteliais, após curto período de exposição (10 semanas após desmame). Neste estudo, mostramos efeitos antagônicos da dieta com prevalência de ácidos graxos saturados (baseada em banha de porco) e da gordura poliinsaturada (alta razão entre Omega 3 e ômega 6), sendo que a primeira estimulou e esta última, restringiu, a taxa de proliferação das células epiteliais e o crescimento total da glândula. No mesmo trabalho, dietas com predominância em ácidos graxos poliinsaturados, mas com razão entre Omega 3 e ômega 6 baixa, apresentou efeito intermediário nos mesmos parâmetros. Este estudo teve como limitações o emprego de uma única espécie e a curta exposição às diferentes dietas.

No presente estudo, definimos se a exposição a dietas normolipídicas baseadas em óleo de linhaça, óleo de soja e banha de porco, que se caracterizam por possuírem diferentes perfis de ácidos graxos afetariam a estrutura e fisiologia

prostática de forma a aumentar a susceptibilidade do órgão aos diferentes tipos de afecções. Para tanto, procuramos determinar se os resultados anteriores obtidos em ratos seriam reproduzidos em duas outras espécies (camundongos e gerbilos da Mongólia), se a extensão do tempo para 32 semanas de exposição às diferentes dietas salientariam os efeitos observados após 12 semanas, se as dietas afetariam aspectos biométricos e metabólicos que poderiam estar relacionados às modificações observadas na próstata.

Os resultados demonstram que diferentes perfis de ácidos graxos em dietas normolipídicas modificam a estrutura e fisiologia prostática, com marcantes alterações no epitélio, resultam em diferentes padrões de inflamação (prostatites) (em camundongos e gerbilos), em diferentes padrões de lesões epiteliais (em gerbilos), e que os parâmetros de termogênese e acúmulo de gordura corporal, parecem afetar o perfil de citocinas/adipocinas, que por sua vez devem ter impacto nas alterações prostáticas. Adicionalmente, alterações no padrão de expressão gênica que antecedem as alterações sistêmicas indicam efeitos diretos da dieta sobre a próstata.

MÉTODOS

Animais

Camundongos C57/BL6 (n=120) e Gerbilos da Mongólia machos (n=15), adquiridos respectivamente no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e na Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), imediatamente após o desmame, foram randomicamente divididos em 3 grupos e acondicionados em biotério com temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro controlado (12h:12h), água e ração *ad libitum*. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA; ID protocolo 3346-1) da UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos em acordo com as normas e guias do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

Dietas

Os animais, receberam dietas (7% de lipídeos) isocalóricas produzidas em acordo com os padrões do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93G) (Reeves et al., 1993) por períodos de 12 (C57/BL6 e Gerbilos) ou 32 semanas (C57/BL6). A fonte de lipídeo utilizada na dieta de cada grupo experimental foi manipulada com intuito obterem-se concentrações diferenciadas de ácidos graxos saturados e poliinsaturados (**Tabela 1**). O grupo PF (Pork Fat) recebeu dieta com lipídeos provenientes da banha de porco processada. O grupos SO (Óleo de Soja) e LO (Óleo de Linhaça) receberam dietas com predomínio de ácidos graxos poliinsaturados, onde o óleo de Soja e o óleo de linhaça foram utilizados como fontes de lipídeos, respectivamente. As dietas foram produzidas pela empresa Pragsoluções (Jaú, SP, Brasil – www.prasolucoes.com.br), e divididas em pequenas alíquotas (100 g), congeladas a -20°C e disponibilizadas aos animais a cada 2 dias com o intuito de prevenir a oxidação e preservar o perfil lipídico das dietas.

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais - AIN93-G

Componentes (g/kg)	LO	SO	PF
Amido de milho	39.75	39.75	39.75
Caseína	20.0	20.0	20.0
Amido de milho	13.2	13.2	13.2
Sacarose	10.0	10.0	10.0
Fibra	5.0	5.0	5.0
Mix de minerais	3.5	3.5	3.5
Mix de vitaminas	1.0	1.0	1.0
L-cisteína	0.3	0.3	0.3
Bitartarato de colina	0.25	0.25	0.25
Tert-Butil-Hidroquinona	0.0014	0.0014	0.0014
Óleo de Linhaça	7.0	-	-
Óleo de Soja	-	7.0	-
Banha de porco	-	-	7.0
Total (g)	100g	100g	100g

SO, Óleo de Soja; LO, Óleo de Linhaça; PF, Banha de Porco.

Procedimentos experimentais

O ganho de peso corporal dos animais (C57/BL6 e gerbilos) foi avaliado semanalmente no mesmo dia e horário da semana. O consumo alimentar, expresso em valores semanais, foi mensurado a cada dois dias, subtraindo a quantidade remanescente da quantidade inicial de ração disponibilizada aos animais. Duas semanas antes do término do período experimental, os animais (C57/BL6) foram submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT), tolerância à insulina (ITT) e ao teste de termogênese induzida pelo frio. O intervalo entre os testes foi de pelo menos 72h. Ao final de doze (C57/BL6 e gerbilos) e trinta e duas semanas de tratamento (C57/BL6), os animais foram anestesiados e o sangue coletado por meio de punção no plexo braquial em tubos contendo anticoagulante EDTA-k3 foi centrifugado (1800 RPM) e armazenado em tubos criogênicos a -80°C. Os animais foram dissecados, todos os órgãos coletados, pesados e avaliados macroscopicamente. Os órgãos com alterações macroscópicas foram analisados histologicamente após coloração pelas Hematoxilina e Eosina (HE). O tecido adiposo interescapular marrom (iBAT) e o tecido adiposo branco epididimal (eWAT) e inguinal (iWAT) dos camundongos foram coletados e imediatamente submetidos a imunohistoquímica ou a técnica de FLIM (*Fluorescence-lifetime imaging microscopy*). A próstata ventral dos animais (camundongos e gerbilos) foi coletada com material cirúrgico estéril, pesada e imediatamente fixada para as análises histológicas e estereológicas (n=5) ou congeladas e armazenadas a -80°C para as análises bioquímicas e moleculares em camundongos (n=5).

Teste de tolerância à glicose (GTT)

Após 6 h de jejum, a glicose sanguínea foi mensurada e, então uma solução de glicose (2.0 g/kg) foi administrada intraperitonealmente. A glicose sanguínea foi aferida depois de 15, 30, 60, 90 e 120 min, por meio de punção sanguínea na veia caudal (NASCIMENTO et al., 2015).

Tolerância a insulina (ITT)

Após 6 h de jejum, a glicose sanguínea foi mensurada e, então uma solução de insulina (1 U/Kg) foi aplicada intraperitonealmente. A glicose foi aferida 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min após a aplicação, por meio de punção sanguínea na veia caudal

(NASCIMENTO et al., 2015).

Fixação e processamento histológico

Os tecidos coletados foram fixados overnight em glutaraldeído 0,45% em tampão de Millonig pH 7.4 (próstata) ou em solução fixadora de Karnovsky (fígado). Os fragmentos, lavados em tampão de Millonig diluído ou água, foram desidratados em série progressiva de álcool (50-100%) e em seguida embebidos em historesina Leica. Os blocos de historesina foram submetidos a microtomia com navalhas de vidro e, os cortes histológicos (2 μ m) obtidos foram corados com hematoxilina e eosina. Para captura das imagens, utilizou-se uma câmera Zeiss Axioxa 506 color acoplada a um microscópio Zeiss Axio Observer Z1 (ROSA-RIBEIRO et al., 2014).

Estereologia

Para estereologia foram capturados 10 campos por corte histológico da próstata de cada animal (n=5 animais/grupo). O volume relativo (densidade volumétrica) dos compartimentos (epitélio, célula muscular lisa, lúmen e estroma) foi calculado a partir do número de pontos correspondentes a cada compartimento e expresso em percentuais. O volume absoluto dos compartimentos foi determinado multiplicando-se o volume relativo pelo peso médio da próstata dos animais, considerando uma relação de 1 g/mL. As contagens foram conduzidas com auxílio do software Image J, por meio da sobreposição das imagens e uma grade com 165 pontos. Todo o procedimento foi realizado como descrito e previamente aplicado (GARCÍA-FLÓREZ; OLIVEIRA; CARVALHO, 2005; HUTTUNEN; ROMPPANEN; HELMINEN, 1981).

Imunofluorescência

Após a coleta do iBAT, eWAT e iWAT, pequenos fragmentos dos diferentes panículos adiposos (diferentes regiões) foram dissecados, coletados aleatoriamente e incubados em placa de cultura 24 wells, contendo meio de cultura RPMI (sem vermelho de fenol) e Mitotracker Orange (M7510) 200 nM, a 37°C durante 30 min. Após lavagem com PBS estéril, os fragmentos foram fixados em paraformaldeído 2% por quarenta e cinco minutos, lavados três vezes por dez min em PBS-T 0,3%.

Em seguida, o bloqueio foi realizado em BSA 4% em PBS-T 0,1% durante 4 horas. Após bloqueio, os fragmentos foram incubados com anticorpo primário (1:1000) Policlonal Goat anti-UCP1 (cat. Sc-6529), overnight a 4°C sob agitação. Após lavagens com PBS-T 0,1% os fragmentos foram incubados com anticorpo secundário diluído 1:2000 durante quatro horas e corados com DAPI para visualização dos núcleos. Os resultados foram visualizados em um microscópio confocal invertido LSM780 NLO e as imagens foram capturadas com sistema de câmera Digital AxioCam 506 color Zeiss.

Fluorescence-lifetime imaging microscopy (FLIM)

Após a coleta dos iBAT, eWAT e iWAT, os diferentes panículos foram rapidamente lavados e mantidos em PBS a 37°C. A autofluorescência do tecido foi identificada ao microscópio confocal LSM780 NLO. Como primeiro parâmetro de análise, foi obtido o espectro de excitação/emissão da fluorescência endógena, utilizando a ferramenta 'lambdascan', e este espectro foi submetido à deconvolução espectral, para identificação dos principais componentes fluorescentes presentes nas células. Este procedimento visou identificar qual a contribuição para o par NADH/FAD na emissão em $\lambda=430\text{nm}$. A seguir, o tempo de vida da fluorescência foi determinado, utilizando o acessório TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting). As curvas obtidas para o tempo de vida da fluorescência foram analisadas no software SPCImage (Becker and Hickl), procurando identificar diferentes componentes de acordo com estudos publicados anteriormente (ADUR et al., 2012; PELEGATI et al., 2012).

Extração, análise da integridade e pureza do RNA

O RNA foi extraído a partir de amostras de próstata, homogeneizadas em (matrizes de lise A; MP Biomedicals) tubos contendo beads de cerâmica e metais de sílica, tampão de lise e β -Mercaptoetano, sob agitação mecânica no aparelho FastPrep[®]. Após homogeneização, o RNA foi precipitado, isolado em coluna de sílica, tratado com DNase e eluído em água livre de RNase, seguindo as recomendações do kit de extração Illustra RNAspin Mini Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire,UK). A concentração e pureza do RNA foi avaliado no aparelho NanoVue^T Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Buckinghamshire,UK)

respectivamente através da absorbância de 260nm e das razões 260/280 e 260/230nm. A integridade do RNA foi avaliada no aparelho Bioanalyzer, através de eletroforese capilar, seguindo as recomendações do Kit RNA 6000 Nano (Agilent). Apenas amostras contendo RIN (RNA Integrity number) superior a 8.0 foram selecionadas e submetidas ao processo de sequenciamento (RNAseq).

Preparação das bibliotecas e sequenciamento de nova geração

O cDNA e as bibliotecas foram produzidas a partir de 2 µg de RNA das amostras de próstatas, utilizando o kit TruSeq Stranded mRNA (Illumina), segundo as recomendações do fabricante. A qualidade das bibliotecas foi avaliada no aparelho Bioanalyzer, através de eletroforese capilar, seguindo as recomendações do Kit RNA 6000 Nano (Agilent). As bibliotecas foram quantificadas individualmente utilizando o kit KAPA Library Quantification (KAPA Biosystems) e, em seguida clusterizadas em uma flowcell através do equipamento cBOT (Illumina).

O sequenciamento das bibliotecas foi realizado em uma plataforma HiSeq 2500 (Illumina). Foi realizado o sequenciamento paired end, produzindo sequências de 100bp (2x). A corrida produziu um total de 1,355,974,797 de fragmentos de 100bp, com 95% das sequências com score acima de Q30. Uma média de 120 milhões de sequências foram produzidas por amostra, sendo que a média de alinhamento contra o genoma *Mus musculus* foi de 93%.

A contagem das sequências alinhadas ao genoma foi realizada com o pacote HTSeqCount (<http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/overview.html>). Para obtenção dos genes diferencialmente expressos (análise de variância), os dados foram normalizados e ajustados para distribuição binomial negativa, corrigidos em função de *outliers* e genes com baixa expressão. Na análise estatística foi utilizado o teste de Wald e a correção para múltiplos testes foi realizada através do procedimento de Benjamini and Hochberg, 1995. Esses procedimentos foram realizados com o pacote DESeq2 (<http://www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/html/DESeq2.html>).

Western Blot

A lise das amostras e a extração de proteína dos fragmentos da próstata foi realizada com sonicador, em solução contendo tampão RIPA (Radio Immunoprecipitation Assay buffer), inibidores de proteases e fosfatases (Coquetel inibidor de protease P8340 da Sigma, Ortovanado e Fluoreto de sódio). Após incubação (2h), as amostras foram centrifugadas (4000xg a 4°C por 10 min), o sobrenadante coletado e a concentração de proteína foi mensurada através do método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando uma curva de albumina sérica como padrão. Aliquotas de proteína total (30 µg) foram resolvidas em gel de poliacrilamida através de eletroforese a 100V por 2h, sob condições não redutoras. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Bioscience) sob temperatura controlada e voltagem constante de 400mA, durante o período de 1 hora. As membranas foram então lavadas 3 vezes com TBS durante cinco minutos e incubadas com solução de bloqueio (BSA 3 a 5% diluído em PBS) durante 1 hora. Em seguida as membranas foram incubadas em anticorpos primários, diluídos 1:1000 em solução de bloqueio (BSA 3%), overnight a 4°C sob agitação. Os anticorpos primários utilizados foram: Rabbit polyclonal anti-androgen receptor (cat. sc816). Após esse processo as membranas foram lavadas três vezes em TBS-T 0,1% e incubadas com anticorpo secundário diluído 1:3.000 (Alexa Fluor 546 Goat anti-Rabbit ou Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit). Após incubação com anticorpo secundário as membranas foram lavadas três vezes durante 10 min, as imagens capturadas no Scanner Typhoon 9410 e analisadas no software ImageQuant TL1 (Amersham Biosciences). A intensidade das bandas foi determinada por densitometria utilizando o software Image J.

Termogênese induzida pelo frio

Após de 6 h de jejum os animais foram expostos a temperatura de 4°C durante o período de 5 h, entre 11:00 e 17:00 para eliminarmos o possível efeito da variação circadiana de UCP1 (GERHART-HINES et al., 2013). As imagens para avaliação da temperatura da superfície corporal foram capturadas previamente e a cada uma hora até o término do teste utilizando uma câmera termográfica, modelo testo 875 (Testo). As imagens foram avaliadas no software Testo –Thermal Image e a temperatura média foi aferida através da média de 100 pontos mensurados na

superfície corporal de cada animal (n=5/grupo) em cada um dos momentos.

Estatística

Os dados foram apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão. Sempre que possível, os valores individuais dentro de cada amostra foram apresentados e o valor médio indicado. Todos os dados foram testados quanto a normalidade, e a diferença entre os grupos foi analisada utilizando a análise de variância de uma (One-way ANOVA) ou duas vias (Two-way ANOVA), seguido respectivamente pelo pós-teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todos os gráficos e análises foram conduzidas no software GraphPad Prism 6.0, San Diego, California, USA.

RESULTADOS

Figura.1

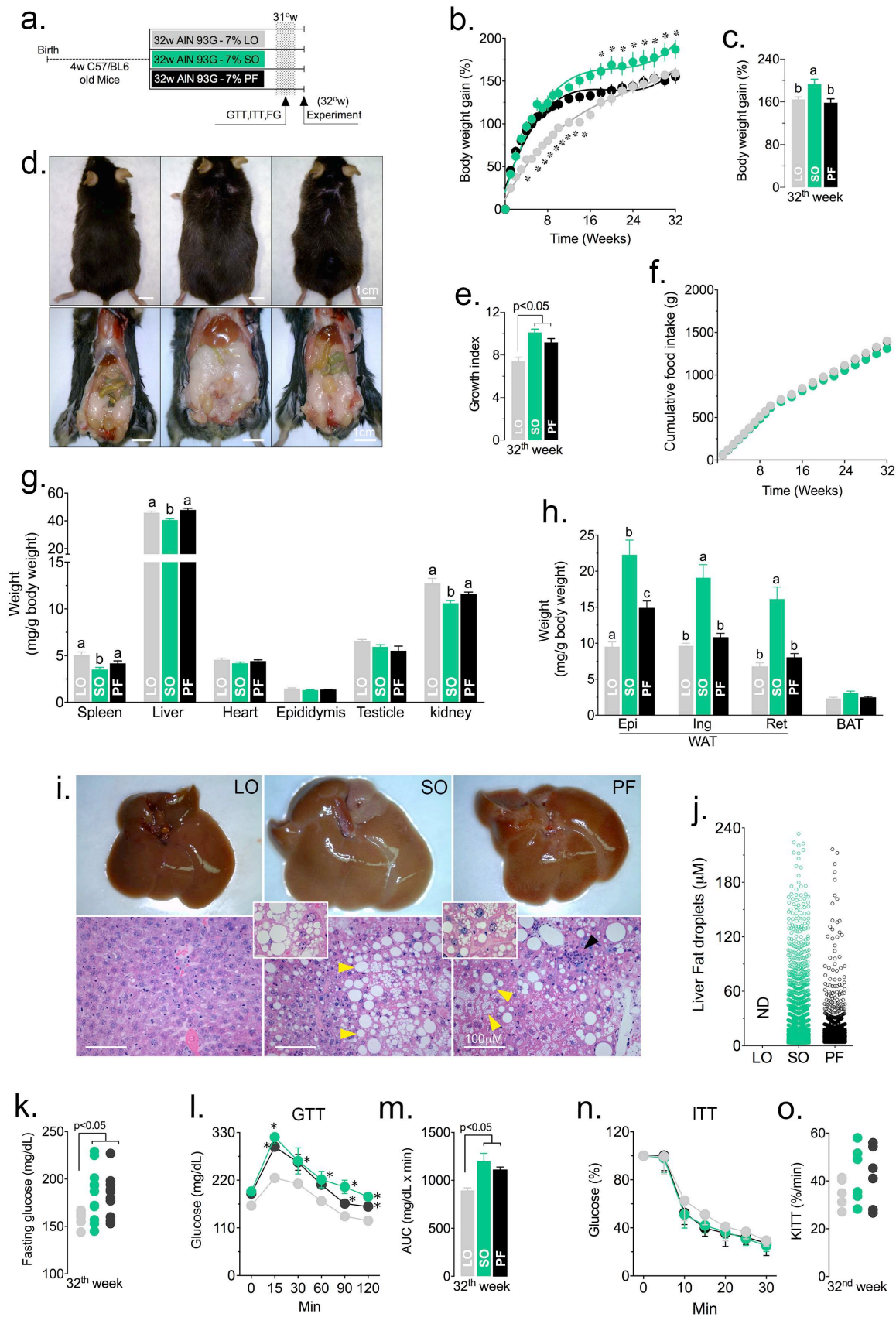


Figura 1. Alterações fenotípicas e metabólicas ocasionadas pela manipulação do perfil lipídico dietético. Camundongos C57/BL6 foram submetidos a dietas com diferentes perfis lipídicos (**Tabela 1**) durante 32 semanas como descrito em (**a**). As dietas foram avaliadas e a sua composição apresentada na **Tabela S1 e Tabela S2**. O ganho de massa corporal (**b,c**), o índice de crescimento (**d,e**) e o consumo dietético foram avaliados semanalmente (**f**). No início da 31ª semana, antes do término do período experimental, a concentração de glicose plasmática em jejum (**k**) foi mensurada e os animais submetidos ao teste de tolerância à glicose (**l**, valores médios de glicose; **m**, área sob a curva) e de tolerância à insulina (**n**, valores médios de glicose plasmática; **o**, constante de decaimento). Ao término de 32 semanas os animais foram sacrificados, os órgãos foram coletados e pesados (**g**). Os órgãos que apresentaram alterações macroscópicas, como o fígado, foram analisados histologicamente com a coloração de HE (**i,j**). $n=6$ (**i-o**) ou 12 (**a-h**); Diferenças estatísticas são indicadas por diferentes letras ou por asterisco ($p<0.05$).

Dietas contendo ácidos graxos poliinsaturados da família ω -3 (LO) apresentam menor ganho de massa corporal e melhor perfil metabólico, quando comparadas a dietas compostas por ácidos graxos poliinsaturados da família ω -6 (SO) ou por ácidos graxos saturados (PF). Camundongos C57/BL6 randomicamente divididos em três grupos foram alimentados com dietas normolipídicas (**Tabela 1**), compostas predominantemente por ácidos graxos poliinsaturados (LO) da família ω -3 (razão ω 3/ ω 6 = 4:1), poliinsaturados (SO) da família ω -6 (razão ω 3/ ω 6 = 1:9) e predominantemente por ácidos graxos saturados (PF), conforme a análise por cromatografia (**Tabela S2**), durante o período de 12 ou 32 semanas (**Figura Suplementar 1a e Fig.1a**). Os animais alimentados com a dieta composta por alto conteúdo de ω 3 (LO) apresentaram menor índice de crescimento e ganho de massa corporal (**Fig.1b-e**), reduzido acúmulo de gordura corporal (**Fig.1h**), fígado com histologia preservada e livre de esteatose hepática (**Fig.1i,j**), níveis de glicose plasmática em jejum (**Fig.1k**) dentro da normalidade e menor área sob a curva durante o GTT (**Fig.1l,m**), indicando maior sensibilidade e tolerância a glicose. As dietas com alto conteúdo de ω 6 e ácidos graxos saturados resultaram em animais com glicose plasmática de jejum (**Fig.1k**) elevada, intolerância a glicose (**Fig.1l,m**) e acúmulo de gordura no fígado, característica do

quadro de esteatose hepática (**Fig.1i,j**). Supreendentemente, a dieta SO mostrou-se mais obesogênica do que a dieta PF e resultou em maior crescimento (**Fig.1d,e**), ganho de massa corporal (**Fig.1b,c**) e acúmulo de gordura corporal (**Fig.1h**).

Figura.2

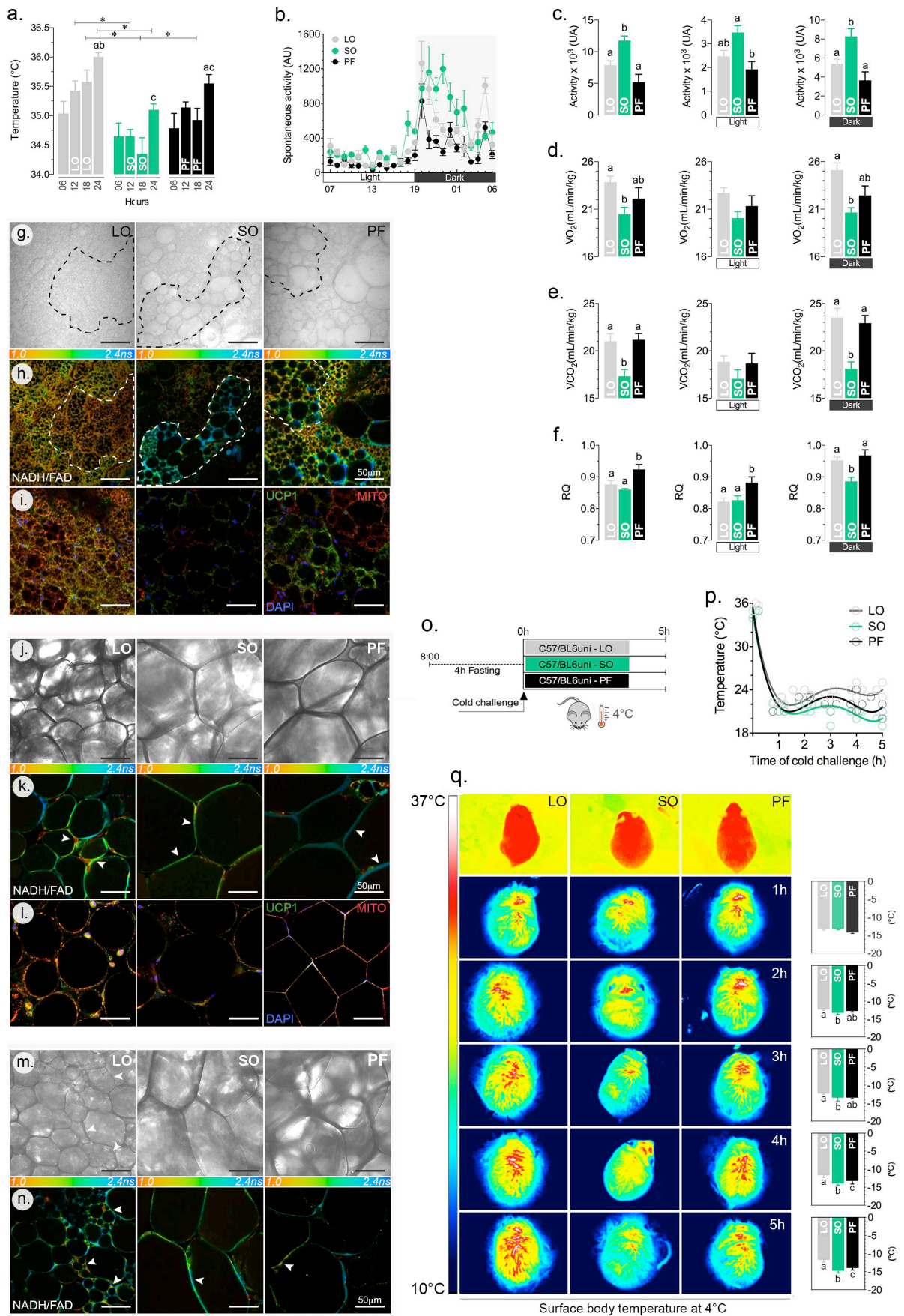


Figura 2. Dietas compostas por diferentes perfis lipídicos modulam diferencialmente o metabolismo energético e a termogênese no tecido adiposo de camundongos C57/BL6. Camundongos submetidos a dietas com diferentes perfis lipídicos durante o período de 32 semanas foram avaliados quanto à temperatura corporal (**a**), a atividade física espontânea (**b,c**), a taxa de consumo de oxigênio (**d**), produção de gás carbônico (**e**) e quociente respiratório (produção de CO₂/consumo de O₂) (**f**) durante os ciclos, claro e escuro por 24h (22°C ± 2). Na 31ª semana, ainda previamente ao término do período experimental, os animais foram expostos à temperatura de 4°C por o período de 5 horas para avaliação da termogênese induzida pelo frio como descrito em (**o**); a temperatura da superfície corporal aferida a cada hora (**p**) foi analisada a partir de imagens obtidas com câmera termostática (**q**). Ao final do período experimental, amostras do tecido adiposo marrom interescapular (**g,h,i**), epididimal (**j,k,l**) e inguinal (**m,n**) foram coletadas e os aspectos histológicos, o estado redox (NADH/FAD) foram avaliados por FLIM (*Fluorescence-lifetime imaging microscopy*) e as mitocôndrias e a proteína UCP-1 avaliadas através da técnica de imunofluorescência (**i,l**). Áreas destacadas por linhas pontilhadas nos painéis **g,h** representam atividade metabólica diferenciada no tecido adiposo marrom interescapular entre LO, SO, PF. As áreas destacadas (**cabeça de seta**) nos painéis **i,j** e **k,l** representam pontos ou regiões com atividade metabólica modulada entre os grupos no tecido adiposo branco, epididimal e inguinal. n = 3 (**g-n**) e n = 6 (**a-f,o-q**); Diferenças estatísticas são indicadas por diferentes letras ou por asteriscos (p<0,05)

Dietas ricas em ω 3 induzem o aumento no metabolismo e na termogênese a despeito do nível de atividade física espontânea. Após a caracterização fenotípica dos camundongos C57/BL6, um novo lote foi randomicamente dividido em 3 grupos e foram alimentados por 32 semanas com as dietas utilizadas no estudo para investigar a relação entre o metabolismo energético, a termogênese e o fenótipo caracterizado e apresentado pelos diferentes grupos na Figura 1 e Fig. Suplementar 1. Animais alimentados com alto conteúdo de ω 3 (**LO**) apresentam maior temperatura corporal (**a**), consumo de O₂ (**d**) e produção de CO₂ (**e**), bem como menor quociente respiratório

(CO₂/O₂) (**f**) ao longo dos ciclos claro e escuro, a despeito de níveis intermediários de atividade física espontânea quando comparado ao grupo **SO** (**b**). Para avaliar a termogênese induzida pelo frio, os animais foram submetidos à temperatura de 4°C por 5 horas como descrito em (**o**). A resposta de termogênese ao frio (**p,q**) foi mais efetivamente controlada nos animais do grupo **LO**, embora nenhum grupo tenha apresentado sensibilidade ao frio e interrupção do teste por risco de óbito. O detalhes das imagens obtidas durante o teste podem ser observadas em (**q**). Ao término do período experimental, a análise do tecido adiposo marrom interescapular (iBAT) (**g,h**) e tecido adiposo branco inguinal (iWAT) (**m,n**) pela técnica de FLIM evidencia que animais alimentados com dietas com alto conteúdo de ω 3 (**LO**) apresentam maior atividade termogênica no iBAT (**h**) bem como maior conteúdo de tecido adiposo bege no iWAT (**n**), e conteúdo de mitocôndrias e UCP1 no iWAT e eWAT (**i,l**). Curiosamente, animais alimentados com as dietas com maior conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados ω 6 (**SO**) apresentaram além de menor temperatura corporal (**a**), menor metabolismo energético (**d,e**), e apesar do maior nível de atividade física espontânea (**b**), pior resposta termogênica ao frio e termogênese constitutiva (iBAT). Os animais alimentados com gordura saturada (**PF**) surpreendentemente apresentaram resposta intermediária ao grupo **LO** e **SO**.

Figura.3

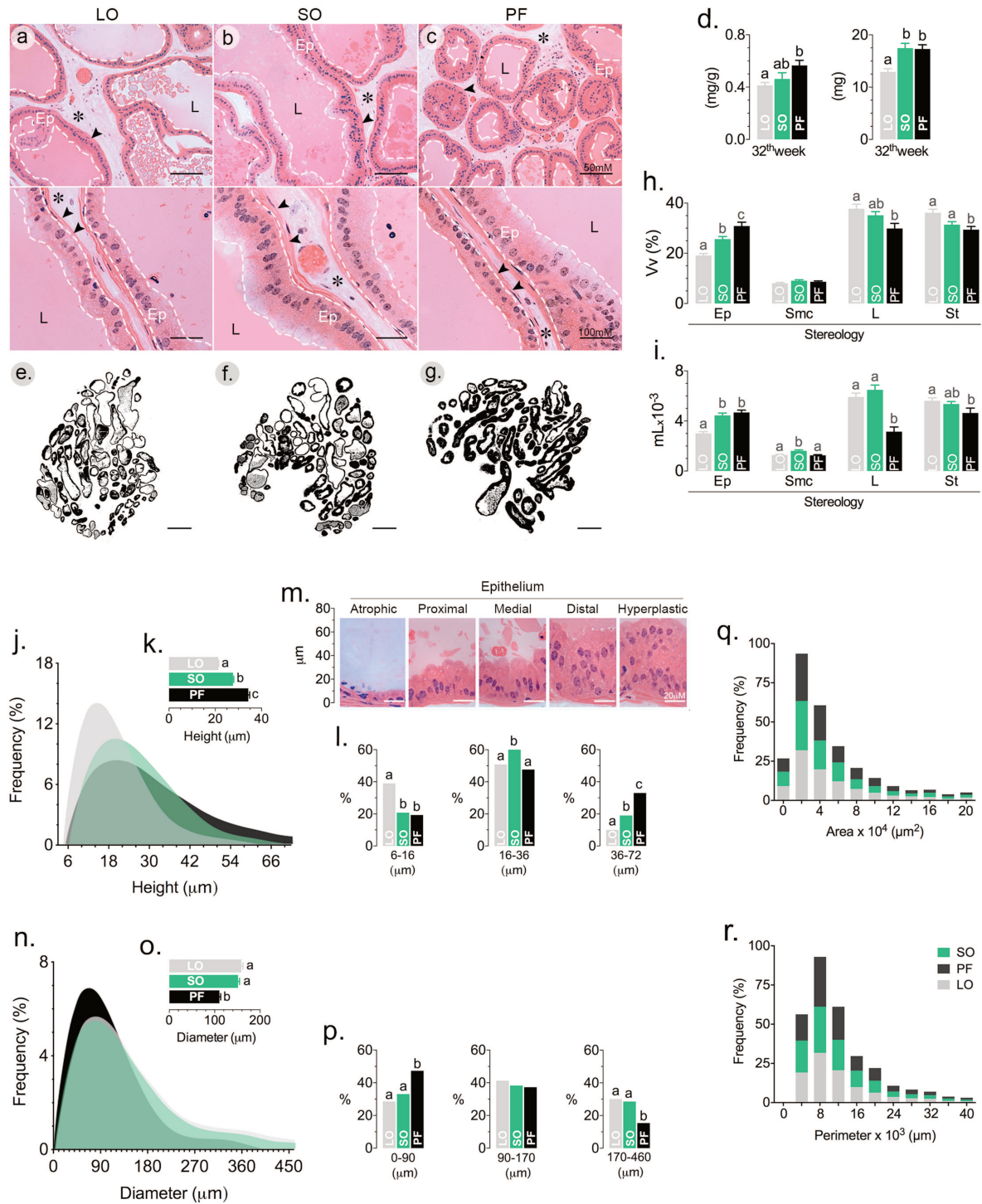


Figure 3. Dietas compostas por diferentes perfis lipídicos modulam a proliferação epitelial e o crescimento da glândula prostática. Após a avaliação do metabolismo e dos parâmetros biométricos (31ª semana), a próstata ventral dos camundongos submetidos às dietas por 10 ou 32 semanas foi coletada e submetida à análise histológica representada de (a-c). O peso relativo e absoluto (d) foram aferidos previamente ao início do processamento histológico. As alterações nas estruturas teciduais (a-c) foram avaliadas por estereologia, em função da variação do volume relativo (h) e absoluto (i) dos compartimentos epitelial (Ep), luminal (L), estromal (*) e do conteúdo de células musculares lisas (**cabeça de seta**) na próstata ventral (VP) dos camundongos. A morfometria foi utilizada para determinação da altura do epitélio (j, frequências de valores; k, valores médios e l, frequências de valores em subclasses de altura do epitélio); do diâmetro dos lúmens (n, frequências de valores; o, média; p, frequências de valores em subclasses de diâmetros do lúmen); da área (q) e do perímetro acinar (r). Em todas as análises n=6; Significância estatística é indicada por diferentes letras (p<0,05).

Dietas com alto conteúdo de $\omega 3$ previnem, enquanto ricas em gordura saturada promovem o desenvolvimento de Hiperplasia Epitelial Prostática. Nos experimentos anteriores, dietas ricas em $\omega 6$ (SO) e gordura saturada (PF) resultaram em piores parâmetros metabólicos e acúmulo de gordura corporal. Embora a dieta do grupo (SO) apresente maior potencial obesogênico, a próstata de camundongos alimentados com dieta rica em gordura saturada (PF) apresentou maior crescimento (d), aumento do conteúdo (h,i) e da altura do Ep (j-l) e diminuição do conteúdo e diâmetro do Lúmen (h,i) como representado em (a-c;e-g). Embora a dieta rica em $\omega 6$ promova o crescimento do órgão (d) e aumento do compartimento epitelial, o diâmetro do Lúmen (h,i) mostrou-se preservado e similar a resposta observada na dieta rica em $\omega 3$, onde foi observada um menor crescimento do órgão, maior conteúdo e diâmetro luminal concomitante a um epitélio com menor altura e conteúdo. Não foram observadas diferenças na área e perímetro acinar (q,r).

Figura 4

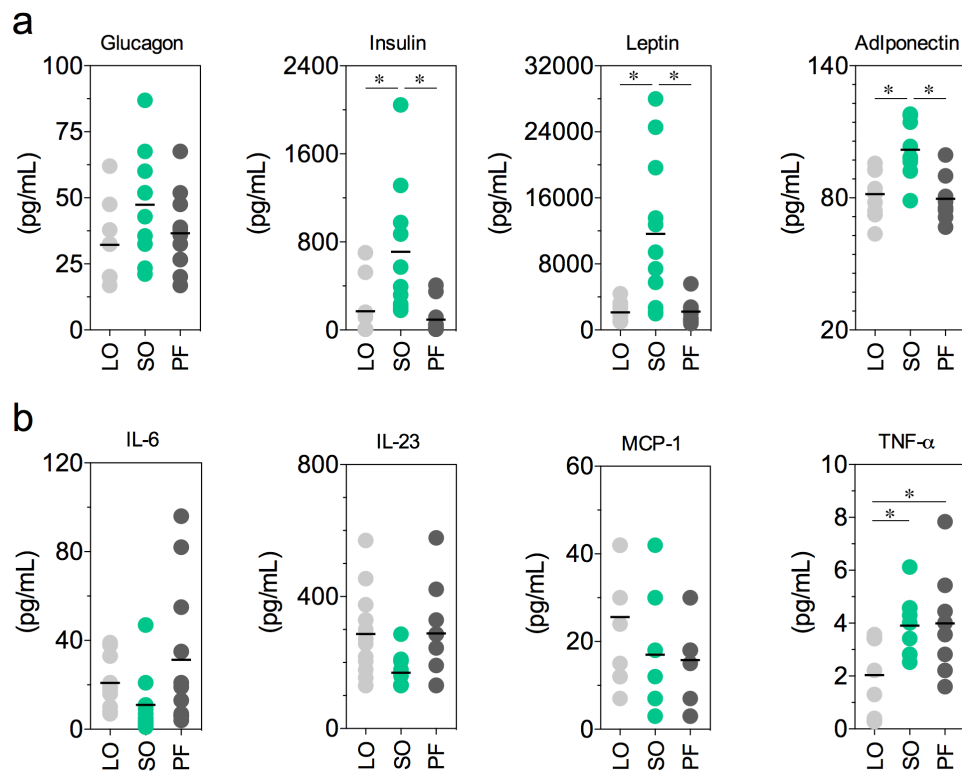


Figura 4. Dietas compostas por diferentes perfis lipídicos modulam as concentrações séricas de hormônios e citocinas pró-inflamatórias. Camundongos C57/BL6 submetidos aos procedimentos dietéticos descritos na **Figura 1a**, ao final do período experimental foram sacrificados, o sangue coletado e as alterações hormonais (**a**: Glucagon, Insulina, Leptina e Adiponectina) e no perfil de citocinas pró-inflamatórias séricas (**b**: IL-6, IL-23, MCP-1 e TNF- α) foram avaliadas. Em todas as análises n=9, significância estatísticas são indicadas por asteriscos (p<0,05).

Dietas ricas em gordura saturada promovem o aumento de citocinas pró-inflamatórias, enquanto ricas em ω 3 apresentam efeito oposto. Já dietas ricas em ω 6 induzem, além do aumento nos níveis de TNF- α circulantes, alterações nos níveis séricos de leptina, insulina e adiponectina. Dada a provável existência de associação entre acúmulo de gordura corporal (obesidade e/ou alto índice de adiposidade), níveis subclínicos de inflamação, secreção de mediadores pró-inflamatórios e o desenvolvimento e progressão de diferentes doenças, dentre elas o

PCa e BHP e as alterações detectadas no acúmulo de gordura corporal resultante das dietas contendo diferentes perfis de ácidos graxos (**Fig.1h** e **Figura Suplementar 1h**) e a função endócrina do tecido adiposo, investigamos as alterações hormonais séricas e perfis de citocinas pró-inflamatórias em resposta a modulação da qualidade dos ácidos graxos da dieta durante o período de 12 (**figura suplementar 3**) e 32 semanas (**figura 4**). Os animais submetidos a doze semanas de dieta não apresentaram alterações nos níveis séricos de hormônios e citocinas. Entretanto, animais submetidos a um longo período (32 semanas) de dieta rica em gordura saturada (PF) ou $\omega 6$ (SO) apresentaram níveis séricos elevados de TNF- α e IL-6 (**b**), o inverso foi observado em animais alimentados com dietas ricas em $\omega 3$ (LO). Os níveis séricos de insulina, leptina e adiponectina (**a**) mostraram-se aumentados nos animais alimentados com dieta rica em $\omega 6$ (SO), que estão associadas a maior ganho de peso (**Fig.1b,c**), com acúmulo de gordura corporal (**Fig.1h**).

Figura 5

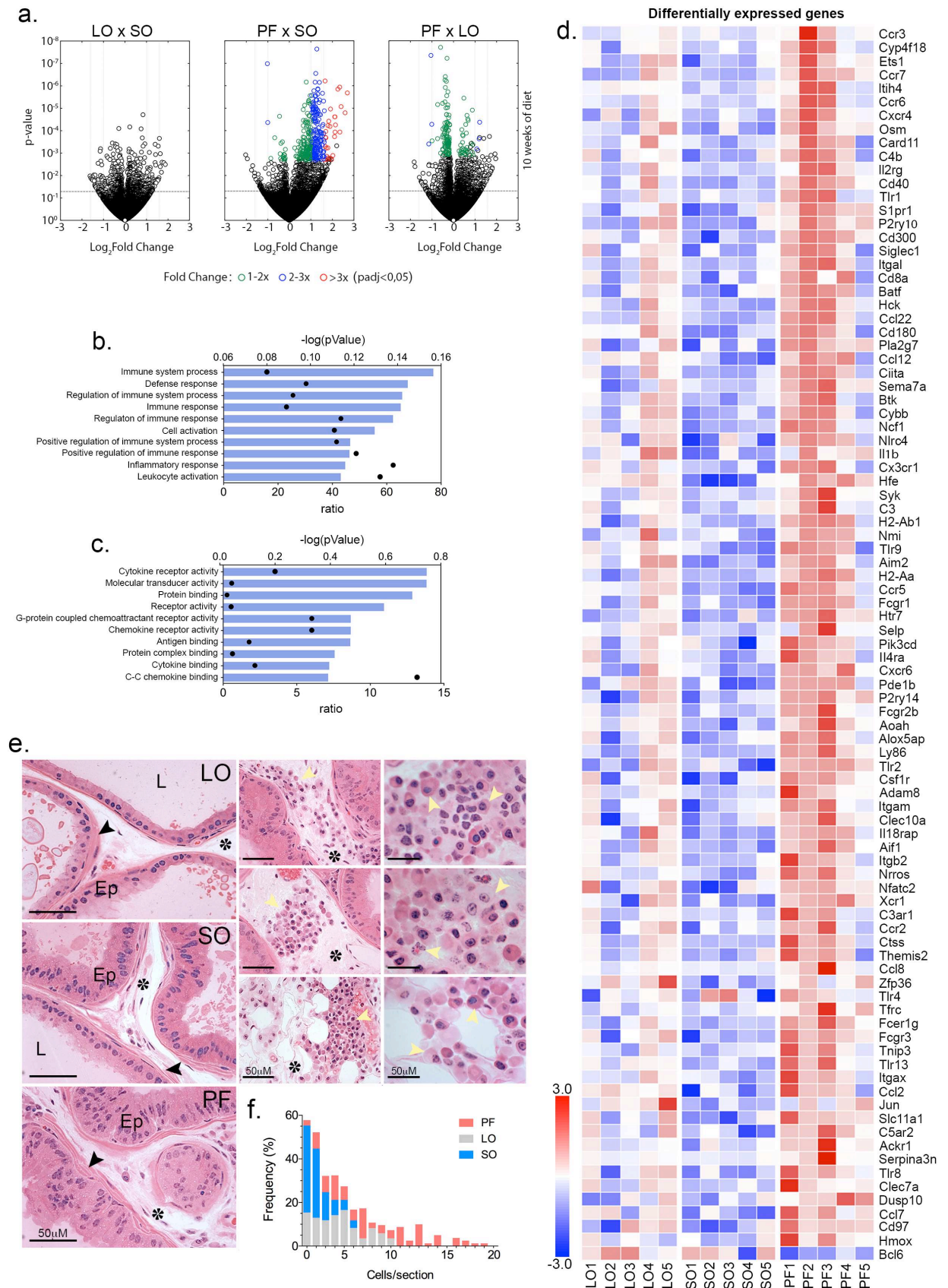


Figure 5. Dietas compostas por diferentes perfis de ácidos graxos modulam o sistema imune e a resposta inflamatória na próstata de camundongos. Camundongos C57/BL6 foram submetidos a diferentes dietas como descrito na **Figura suplementar 1a**. A influência do perfil de ácidos graxos na dieta sobre o transcriptoma da próstata foi avaliado pela técnica de RNAseq. Os genes diferencialmente expressos entre as dietas foram representados (comparações aos pares) por gráficos do tipo “Volcano Plot”(a); o gráfico mostra a expressão de cada gene (**Log2 Fold Change**) e o p-valor correspondente entre as comparações aos pares. O p-valor ($p < 0.05$) ajustado para múltiplos está representado por diferentes cores. Os processos biológicos e funções moleculares moduladas pela composição das dietas foram apresentadas em (b,c) de acordo com sua significância; as barras representam os p-valores e os pontos representam a razão (*ratio*) entre os número de genes diferencialmente expressos e o número total de genes anotados que compõem a ontologia. O efeito do perfil lipídico sobre os genes diferencialmente expressos e relacionados ao processo inflamatório foi representado na forma de *heatmap* (d); para construção da matriz foram utilizados valores de expressão normalizados (**Z-Score**) de cada gene (n=5). (e) Aspectos das células do sistema imune e de infiltrados inflamatórios encontrados na próstata dos animais submetidos às diferentes dietas (32 semanas). O efeito da modulação das vias gênicas relacionadas à resposta inflamatória e o sistema imune (a-d) em animais submetidos as dietas experimentais pelo período de 12 semanas pode ser observado na histologia da próstata (e,f) dos animais submetidos a uma das dietas pelo período de 32 semanas conforme protocolo descrito na Figura 1a; epitélio (Ep), lúmen (L), estroma (*), célula muscular lisa (ponta de seta preta), infiltrado inflamatório (ponta de seta, amarela). Nestes experimentos, n=5 (a-d) ou n=6 (e-f). (f) Avaliação quantitativa do infiltrado inflamatório foi apresentando em função do número de células por campo histológico (n=6/grupo; 2 cortes/animal; 10 campos/por corte).

Dietas ricas em gordura saturada e $\omega 6$ modulam o sistema imune e a inflamação de maneira inversa, enquanto a gordura saturada induz o $\omega 6$ previne o desenvolvimento da inflamação na próstata. Devido às alterações sugestivas do quadro de Hiperplasia Benigna prostática nos camundongos submetidos à uma das dietas descritas na **Figura Suplementar 1a**, decidimos avaliar através do RNAseq, quais genes ou vias poderiam estar relacionas à

alterações detectadas na estrutura da próstata (**Figura suplementar 2 e Figura 3**). Um total de 361 genes foram diferencialmente expressos na próstata ventral do grupo PF quando comparamos ao grupo SO, 340 genes up-regulated e 21 genes down-regulated. Quando comparamos o grupo PF com o LO um total de 149 genes apresentaram expressão diferencial, sendo 41 up-regulated e 108 down-regulated (**Volcano-plot, Fig.5a**). Não foram observados genes diferencialmente expressos entre os grupos LO e SO.

O enriquecimento de vias, redes ou processos biológicos foram calculados para um conjunto de genes utilizando o software Metacore (Thomas-Reuter). Quando comparamos o grupo PF e o SO, para genes up-regulated foram detectados 1822 processos biológicos, 97 vias e 27 redes significativamente enriquecidas ($p < 0.05$), dentre os quais a maioria dos processos biológicos relacionados ao sistema imune e a resposta inflamatória, bem como a regulação destes processos; redes relacionadas ao processo de quimiotaxia, quimiotaxia de leucócitos, inflamação mediada por IL-4 e via JAK/STAT, modulação de processos relacionados à apresentação antigénica, fagocitose, ação de células NK (Natural Killer Cell) e proliferação de linfócitos; e por fim vias relacionadas a sinalização mediada por Toll-like receptors (TLR1, TLR2, TLR4, TLR8, TLR9, TLR13 IL1 β e PI3K), adesão e migração celular mediada por integrinas e quimiocinas CCL2, CCL16, CCL20, CXCL16 e CCL25 (CCR5, CCR6, CXCR6, PI3K, Stromelysin-1), quimiotaxia mediada por receptores de quimiocinas CXCR4 e CCR3 (CCL8, CCL7 e CCL3), sinalização mediada pela ativação do sistema complemento (C3a), formação das sinapses imunológicas e estresse oxidativo. Para os genes down-regulated foram observadas redes relacionadas com ritmo circadiano e ao enovelamento de proteínas, embora não significativamente enriquecidas (p -valor: 0,08; FDR:0,24).

Quando comparamos o grupo PF e o LO para os genes up e down-regulated foram observados respectivamente 1082 e 117 processos biológicos significativamente enriquecidos, porém não foram observadas vias e redes enriquecidas com exceção de apenas 1 via relacionada ao papel de proteínas quinases similares a proteína NIMA (NEKs) no controle do ciclo celular para os genes down-regulated.

Figura 6

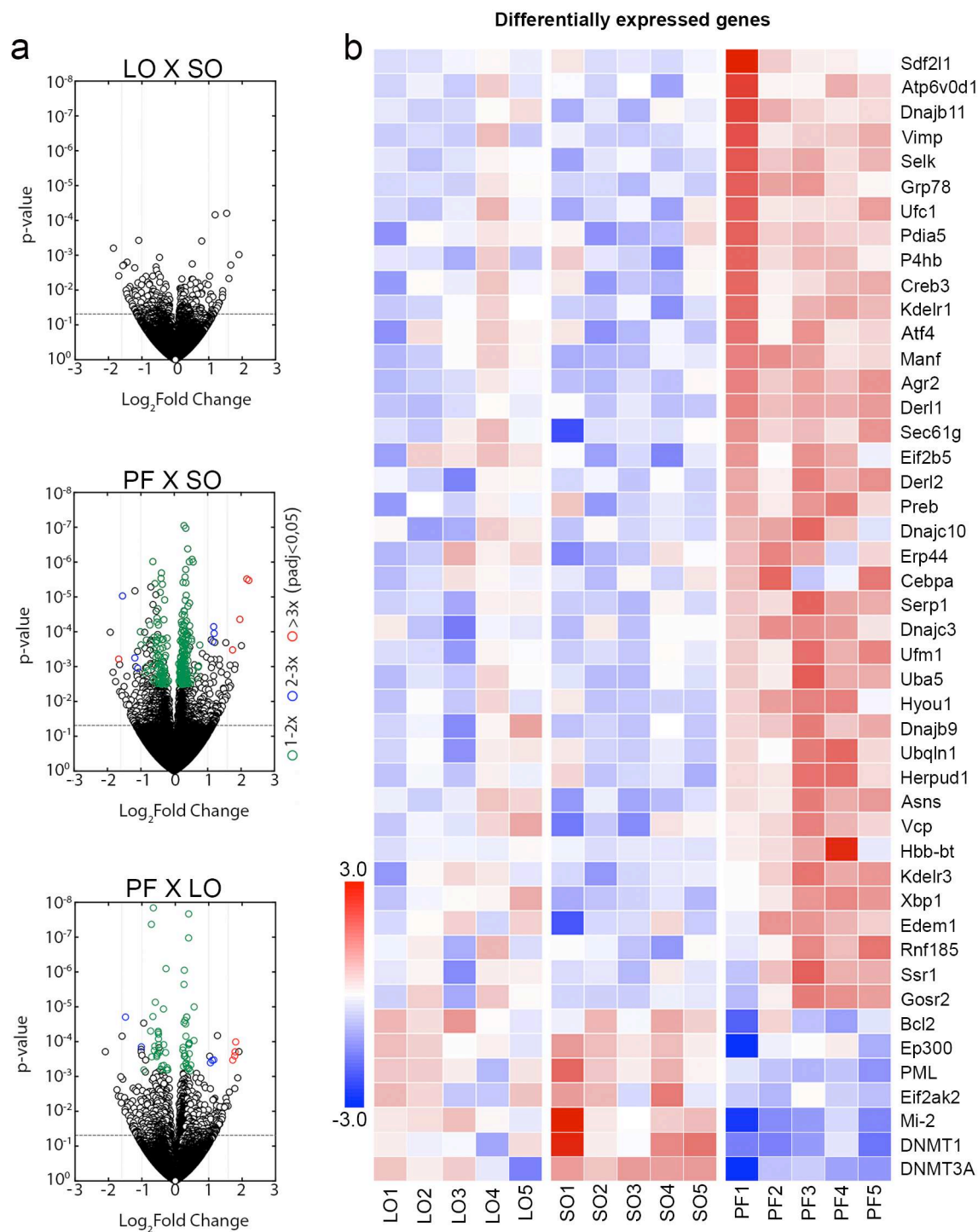


Figure 6. Dietas com diferentes perfis lipídicos modulam diferencialmente a expressão de genes relacionados ao enovelamento protéico, ao estresse de retículo e à resposta adaptativa ao acúmulo de proteínas desenoveladas (Unfolded Protein Response - UPR). Camundongos C57/BL6 foram submetidos a uma das dietas como descrito na **Figura 1a**. A influência do perfil lipídico da dieta sobre o transcriptoma da próstata de animais tratados por trinta e duas semanas foi avaliado pela técnica de RNAseq. Os genes diferencialmente expressos entre as dietas foram representados (comparações aos pares) por gráficos do tipo “Volcano Plot” (**a**); o gráfico mostra a expressão de cada gene (Log2 Fold Change) e o *p*-valor correspondente entre as comparações aos pares. Os processos biológicos e funções moleculares moduladas pela composição das dietas foram apresentadas em (**c,d**) de acordo com sua significância; as barras representam os *p*-valores e os pontos representam a razão (*ratio*) entre os número de genes diferencialmente expressos e o número total de genes anotados que compõem a ontologia. O efeito do perfil lipídico sobre os genes diferencialmente expressos e relacionados ao estresse de retículo e a via UPR foi representado na forma de heatmap (**d**); para construção da matriz foram utilizados valores de expressão normalizados (Z-Score) de cada gene (n=5).

Dietas ricas em gordura saturada promovem o estresse de retículo e ativação da via UPR. Nos experimentos anteriores (**Figura suplementar 1a**) verificamos que dietas ricas em ácidos graxos saturados (**PF**) empregadas pelo período de 12 semanas estimulam o crescimento da próstata (**Figura suplementar 2**) e a expressão de genes relacionados à inflamação (**Figura 5**). Tais efeitos não foram observados nos animais submetidos a dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados (**SO** e **LO**). Aumentando o tempo de dieta, verificamos que o grupo PF desenvolve hiperplasia epitelial (**Figura 3**) associada a inflamação (**Figura.5e-f**). Dietas baseada em LO resultam em aumento da frequência de atrofia epitelial e resposta inflamatória local, com predomínio de infiltrados intra-luminais (embora necessária a confirmação por imuno-histoquímica).

A análise do transcriptoma revelou um total de 301 genes diferencialmente expressos na próstata do grupo **PF** quando comparado ao grupo **SO**, 206 genes up-regulated e 95 genes down-regulated. Quando comparamos o grupo **PF** com o **LO**

um total de 72 genes apresentaram expressão diferencial, sendo 40 up-regulated e 32 down-regulated (Volcano-plot, **Fig.6a**). Não foram observados genes diferencialmente expressos entre os grupos LO e SO.

O enriquecimento de vias, redes ou processos biológicos foram calculados para um conjunto de genes utilizando o software Metacore (Thomas-Reuter) e quando comparados o grupo **PF** e o **SO**, para genes up-regulated foram detectados 322 processos biológicos, 8 vias e 6 redes significativamente enriquecidas ($p < 0.05$), dentre os quais a maioria dos processos biológicos relacionados à síntese, degradação, transporte e enovelamento de proteínas, ao estresse de retículo bem como a regulação da resposta a proteínas desenoveladas (UPR – Unfolding protein response); vias relacionadas ao controle da apoptose ou sobrevivência celular e redes relacionadas ao do folding de proteínas, a ativação da via UPR e controle do processo de transcrição e ubiquitinação/degradação proteassomal de proteínas e degradação citoplasmática de mRNAs. Para os genes down-regulated foram detectados 481 processos biológicos e apenas 1 via significativamente enriquecida relacionada ao papel da família de proteínas HP1 (Heterocromatin protein 1) no silenciamento transcricional. Os processos biológicos estão relacionados à modificação resposta de defesa contra vírus e outros patógenos, bem como a sinalização mediada por células B decorrente da ligação entre antígeno/receptor.

Quando comparados o grupo **PF** e o **LO**, as ontologias, processos e vias relacionadas ao estresse de retículo e a resposta adaptativa ao estresse, também mostraram-se enriquecidas no grupo PF, porém com quantidade inferior de genes diferencialmente expressos. Os genes diferencialmente expressos podem ser observados no heatmap apresentado no painel **b**.

Figura 7

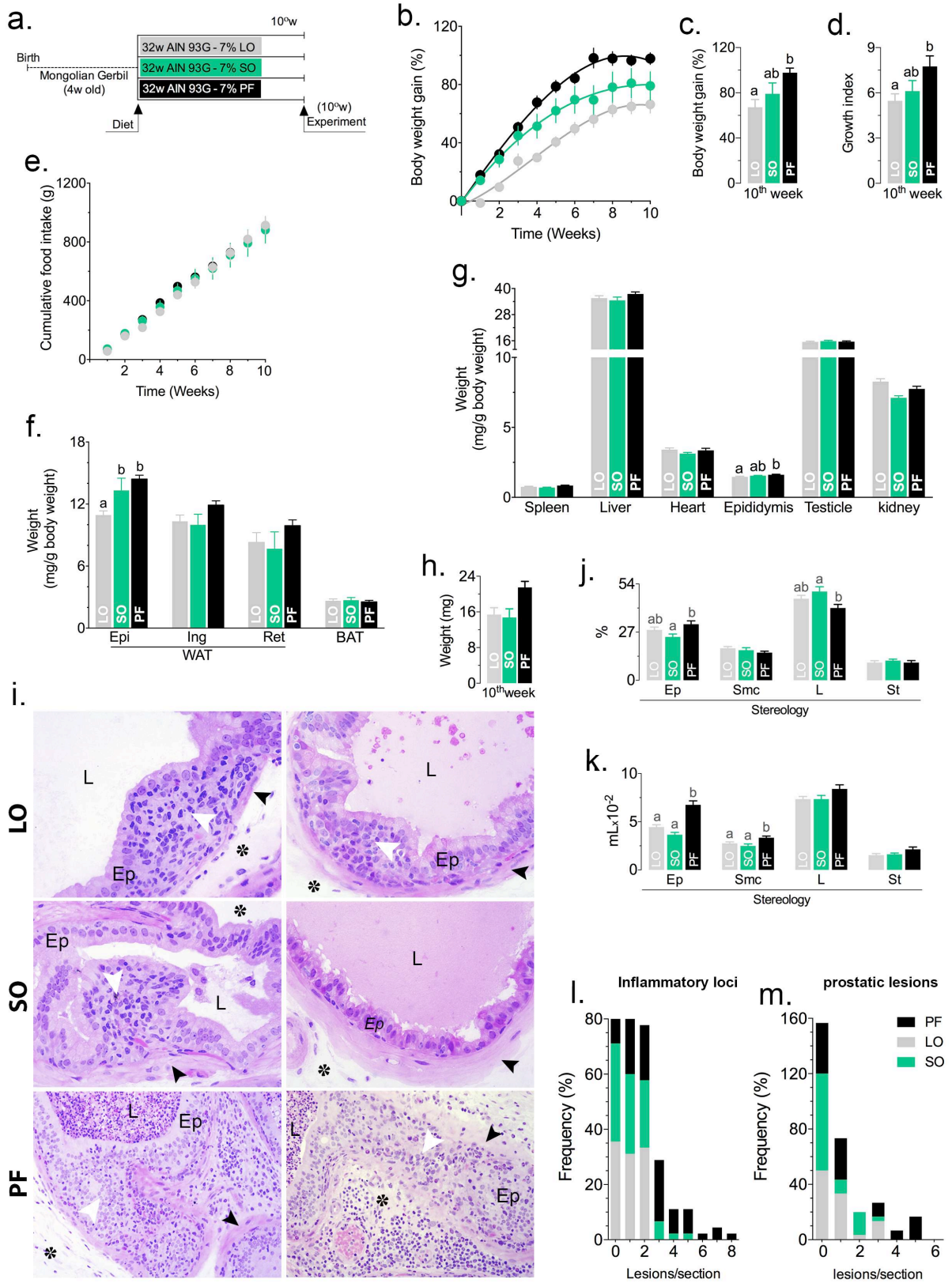


Figure 7. A inflamação e as lesões na próstata do Gerbilo da Môngolia são moduladas pelo perfil lipídico da dieta. Gerbilos da Mongólia foram submetidos a dietas com diferentes constituições lipídicas por 12 semanas como descrito em (a). A massa corporal (b,c), o crescimento (d) e a ingestão alimentar (e) foram avaliados semanalmente. Ao final do experimento os animais foram sacrificados, os órgãos (g) e tecidos gordurosos (f) coletados, pesados e analisados macroscopicamente. A próstata foi pesada (h), submetida ao processamento histológico e corada com HE para análise da histologia como apresentando no painel (i). As alterações estruturais nos tecidos foram avaliadas por estereologia, através da variação do volume relativo (j) e absoluto (k) dos compartimentos epitelial (Ep), luminal (L), estromal (*) e das células musculares lisas (ponta de seta preta) na próstata ventral (VP) dos Gerbilos. Além das alterações estruturais foram avaliadas a incidência de sítios inflamatórios (l) e de lesões epiteliais (m) induzidas pela manipulação dos ácidos graxos da dieta. Em todas as análises n=6; Significância estatística é indicada por diferentes letras ou pelos asteriscos (p<0.05).

Dietas com ácidos graxos saturados e com alto conteúdo de $\omega 3$ aumentam a incidência de lesões na próstata de gerbilos da Mongólia. Nos experimentos anteriores, constatamos que apesar do maior potencial obesogênico das dietas ricas em $\omega 6$ (SO) a próstata dos animais alimentados com dieta com alto conteúdo de $\omega 3$ apresentou uma ativação da resposta inflamatória e estresse retículo ainda que mais brando se comparado ao grupo PF e em uma pequena parcela dos animais, porém não foram encontrados alterações ou anomalias epiteliais condizentes com lesões. Com o objetivo de avaliarmos o potencial e a predisposição a lesões, Gerbilos Mongólia foram submetidos às dietas com diferentes perfis lipídicos durante o período de 12 semanas conforme protocolo descrito (a). A dieta rica em ácido graxo saturado apresentou maior potencial obesogênico (b,c), os animais apresentaram maior taxa de crescimento (d) a despeito do consumo alimentar semelhante (e), maior deposição de gordura epididimal (f) e aumento no peso do epidídimo (g). Em decorrência ao alto conteúdo de gordura saturada, as próstatas dos animais alimentados com a dieta PF apresentaram aumento no tamanho e peso (h), aumento do compartimento epitelial e do conteúdo de células musculares lisas (j,k), aumento dos focos inflamação (l) e de alterações ou anomalias epiteliais correspondentes à lesões (m), como representado no painel (i). Já as dietas ricas

em gordura poliinsaturados, com alto (**LO**) e baixo (**SO**) ω -ratio, promoveram uma redução do tamanho e peso das próstatas, do compartimento epitelial e do volume de células musculares lisas. Também resultaram em menor incidência de focos inflamatórios e lesões epiteliais, embora, dentre elas, a dieta rica em ω 3 tenha mostrado maior.

VII. DISCUSSÃO

As prostatites, a hiperplasia prostática benigna (BHP) e o adenocarcinoma são as doenças mais comuns da glândula prostática que comprometem a qualidade de vida de homens em diferentes idades. A incidência destas afecções aumenta com a idade. O diagnóstico de BHP e câncer é feito usualmente a partir dos 50-55 anos. A maioria dos casos de câncer é diagnosticado a partir dos 65 anos. Aos 70-85 anos a maioria dos homens (80%) apresenta evidências histológicas de BHP ou de câncer de próstata (BERRY et al., 1984; GRÖNBERG, 2003). Apesar da incidência e dos avanços no estudo da BHP e do PCa, a etiopatogenia permanece como ponto fundamental de investigação. Diversos fatores de risco como o componente genético, a obesidade, fatores endócrinos, hereditários e étnicos estão associados ao desenvolvimento e progressão dessas doenças. Estudos epidemiológicos com populações de imigrantes sugerem que fatores nutricionais desempenham papel fundamental no desenvolvimento e progressão da BHP e do PCa (LEE et al., 2007; SHIMIZU et al., 1991).

Os ácidos graxos são considerados importantes fatores ambientais e nutricionais associados às prostatites, à BHP e ao PCa. Em países ocidentais, onde a dieta é composta por alimentos industrializados e ricos em ácidos graxos saturados (40-50%), a incidência das doenças associadas à glândula prostática é alarmante. Em modelo de camundongo transgênico para o adenocarcinoma de próstata (TRAMP) e em ratos Wistar, a alimentação baseada na dieta ocidental, rica em gordura saturada (40%), promove o aumento da proliferação epitelial e estromal, o desenvolvimento de carcinoma e a diminuição da taxa de sobrevivência (CHO et al., 2015; FURRIEL et al., 2014). Além da quantidade, estudos vem demonstrando que o perfil e a qualidade dos ácidos graxos presentes na dieta representam um ponto crucial na progressão e desenvolvimento da BHP e do PCa. Entretanto, os estudos epidemiológicos e experimentais são controversos e inconclusivos. Recentemente demonstramos, em modelo animal, que o perfil lipídico dos ácidos graxos em dietas normolipídicas (7%), influencia a proliferação epitelial e, que essas alterações estão relacionadas com os conteúdos de receptor de andrógeno e de PPAR γ (ESCOBAR; GOMES-MARCONDES; CARVALHO, 2009). Em particular, a dieta baseada em banha de porco resultou em hiperplasia epitelial, enquanto a dieta baseada em óleo de linhaça diminuiu a taxa de proliferação das células epiteliais.

Estes resultados permitiram o estabelecimento de correlação entre o percentual de ácidos graxos insaturados e maior susceptibilidade à incidência de neoplasias epiteliais, embora o trabalho tenha se restringido a curta exposição (12 semanas) e a uma única espécie (ratos). É importante ressaltar que o período de exposição por 12 semanas após o desmame abrange a puberdade dos animais (VILAMAIOR; TABOGA; CARVALHO, 2006).

No presente estudo, investigamos se os efeitos observados em ratos seriam reproduzidos em outras espécies, se o aumento do tempo de exposição para 32 semanas a dietas baseadas em óleo de linhaça (67,4% AGPI, ω -ratio = 3,70), óleo de soja (52,7% AGPI, ω -ratio = 0,11) e banha de porco (13,1% AGPI, ω -ratio = 0,07), salientariam os efeitos observados em curto prazo, e quais os aspectos sistêmicos modulados pela dieta poderiam estar associados aos efeitos locais particulares da próstata. O aumento do tempo de exposição visava também aumentar a probabilidade de que os elementos de predisposição se manifestassem em lesões características das doenças prostáticas. Incluímos neste estudo uma análise do transcriptoma do órgão nas diferentes condições experimentais (tempo e dietas), que pudesse revelar aspectos subjacentes em nível molecular associados à fisiologia do órgão e às diferentes afecções.

Na primeira parte do estudo, mostramos que o perfil dos ácidos graxos presentes em dietas normolipídicas modula o crescimento, o ganho de peso, o acúmulo de gordura hepática (Esteatose hepática) e corporal, além de parâmetros associados a homeostase e equilíbrio glicêmico. A dieta baseada em óleo de linhaça, rica AGPIs e ω -ratio alto, resultou em animais menores, com menor deposição de gordura no tecido adiposo, ausência de esteatose hepática. Supreendentemente, a dieta baseada em óleo de soja, que tem conteúdo intermediário de AGPIs e ω -ratio reduzido, apresentou efeito oposto, resultando em maior crescimento dos animais, ganho de peso, acúmulo de gordura corporal e esteatose hepática.

Os resultados são consistentes com a literatura, onde o consumo de ácidos graxos poliinsaturados ricos em ω -3 previne o desenvolvimento de altos índices de adiposidade corporal, obesidade, resistência à insulina e a esteatose hepática, todos associados à síndrome metabólica (LIU et al., 2013; PELLIZZON et al., 2002; UKROPEC et al., 2003).

Mais surpreendente ainda foi o padrão de crescimento bifásico encontrado

para os animais que foram alimentados com dieta normolipídica baseada em banha de porco. Num primeiro momento, o crescimento dos animais, avaliado pelo ganho de peso, foi similar ao dos animais expostos à soja. Após uma evidente transição na taxa de ganho de peso, que acontece entre 10-12 semanas, os animais adultos adquirem composição corporal (peso e adiposidade) semelhante à dos animais alimentados com dieta normolipídica baseada em óleo de linhaça, tendo acúmulo de gordura epididimal como única exceção.

O potencial obesogênico do óleo de soja foi demonstrado em diversos estudos utilizando modelo *High fat diet* (ALVHEIM et al., 2012; DEOL et al., 2015; MIDTBØ et al., 2013; PELLIZZON et al., 2002), mas vale ressaltar que este estudo é o primeiro a demonstrar o potencial obesogênico do óleo de soja em dietas normolipídicas (7% de ácidos graxos).

Estes padrões de crescimento do animal e de acúmulo de gordura mostraram associação estreita e negativa com a capacidade termogênica dos animais nos diferentes grupos experimentais.

A termogênese e o metabolismo mostraram-se reduzidos nos animais alimentados com dieta baseadas em óleo de soja, ao contrário dos animais nos outros grupos. Nestes últimos, o aumento da termogênese e do metabolismo foram mediados por maior quantidade e atividade de mitocôndrias e maior conteúdo de UCP1, no tecido adiposo interescapular marrom e no tecido adiposo branco subcutâneo.

In vitro e in vivo derivados do metabolismo do AA inibem a biogênese mitocondrial e a síntese de UCP1 no tecido adiposo marrom interescapular, assim como a diferenciação do tecido adiposo branco (subcutâneo) em tecido adiposo (ALVHEIM et al., 2012; PISANI et al., 2014). Espera-se então que, os ácidos graxos $\omega 6$ presentes na soja possam ser substratos para a produção de AA, que por sua vez, inibe a termogênese. Por outro lado, a predominância de $\omega 3$ na linhaça que estimula a síntese de UCP1 no tecido marrom interescapular e o *Browning* no tecido adiposo subcutâneo, contribuindo para aumento do gasto calórico e termogênese, com concomitante redução dos depósitos de gordura e do crescimento dos animais (MADSEN; PETERSEN; KRISTIANSEN, 2005; PISANI et al., 2014; TAKAHASHI; IDE, 2000). O aumento nos níveis hormonais de leptina, insulina e adiponectina no plasma de animais alimentados com dietas contendo óleo de soja representa, além do quadro de intolerância a glicose e aumento da adiposidade, um mecanismo

compensatório para reduzir a ingesta alimentar e estimular o gasto calórico (TAKAHASHI; IDE, 2000).

O aumento da adiposidade tem papel central no desenvolvimento de diferentes doenças. A secreção de uma ampla variedade de fatores pelo tecido adiposo promove o *crosstalk* com outros tecidos, influenciando a fisiologia e à susceptibilidade à doenças. A obesidade e a resistência à insulina são considerados fatores de riscos para o desenvolvimento da BHP e do câncer de próstata.

As análises de parâmetros fisiológicos e metabólicos derivados da exposição a dietas normolipídicas com diferentes perfis de ácidos graxos, permitiu dissociar o parâmetro adiposidade (i.e. volume total e hipertrofia do adipócito) do crescimento prostático, uma vez que soja e banha resultam em adiposidade diferente e dimensões prostáticas similares. Por outro lado, a banha que resulta em menor adiposidade, perturba a estrutura glandular, em particular aumentando o volume do epitélio com concomitante redução do volume do lúmen. Assim, preservamos os termos hiperplasia epitelial para o efeito causado pela banha e o termo crescimento (no Inglês, *enlargement*) para o efeito causado pela soja, uma vez que as proporções entre os compartimentos teciduais são preservadas.

Adicionalmente, os animais submetidos às dietas normolipídicas ricas em gordura saturada (banha de porco) ou com predominância de ω -3 (óleo de linhaça), apresentaram deposição de gordura semelhantes, porém impactos totalmente diferenciados sobre a próstata. Enquanto a dieta rica em gordura saturada, característica da dieta baseada em banha de porco, promoveu o aumento do peso da próstata, associado a hiperplasia epitelial (com redução do volume do lúmen), a dieta baseada em óleo de linhaça, com predominância de ω -3, restringiu o crescimento do órgão e do epitélio, embora tenha resultado em focos de atrofia epitelial.

As próstatas dos animais alimentados com dieta rica em ácido graxo saturado (banha de porco), que apresentaram maior crescimento e hiperplasia epitelial, também apresentaram aumento do número de células do sistema imune após 32 semanas, claramente caracterizando infiltrados inflamatórios. Este é um achado importante, pois estabelece ligação direta entre dieta e surgimento de prostatites não-infecciosas. Até então, a alta incidência e a predominância de prostatites não-infecciosas sobre as infecciosas era enigma para os estudiosos.

Infiltrados inflamatórios também foram observados nas próstatas de animais

alimentados com dietas baseadas em óleo de linhaça. Estes infiltrados são nitidamente diferentes daqueles observados no grupo banha de porco, mas caracterizam inflamação. Estes dados permitem concluir que tanto a dieta baseada em banha, como a dieta baseada em linhaça resultam em “prostatites” e contrastam com visão geral de que predomínio em $\omega 6$ tem atividade pró-inflamatória e que $\omega 3$ tem atividade anti-inflamatória. Células inflamatórias foram raras nos animais que receberam dieta baseada em óleo de soja.

Além do aumento das taxas proliferação e de lesões epiteliais, observadas em amostras de BHP e PCa, é frequente a presença de infiltrado inflamatório. A análise do transcriptoma das próstatas dos animais submetidos às dietas normolipídicas por 12 semanas, mostrou alterações de vias e redes gênicas relacionadas a modulação do sistema imune e processo inflamatório em função perfil de ácidos graxos presentes na dieta. Nesse contexto, a dieta rica em ácidos graxos saturados (banha) se caracterizou pela expressão de genes relacionados à inflamação mediada por membros da família dos Toll-like receptors (TLR1, TLR2, TLR4, TLR8, TLR9, TLR13). Estes dados são condizentes com o fato de que estes receptores, em particular o TLR4, são elementos chave na ativação da via NF κ B em resposta a ácidos graxos saturados no hipotálamo ((LIU et al., 2013; MILANSKI et al., 2009), em outros tecidos (LIU et al., 2013) e na próstata (LIU et al., 2014), em modelos de *High Fat Diet*.

Embora o potencial pró- e anti-inflamatório de dietas respectivamente com alta e baixa razão entre os ácidos ω -3/ ω -6 seja amplamente disseminado na literatura (KÖNNER; BRÜNING, 2011; LIU et al., 2013), demonstramos efeitos opostos, onde a dieta normolipídica rica em o óleo de soja (baixa razão entre ω -3/ ω -6), não tem associação com inflamação e recrutamento de células do sistema imune.

Seria esperado que a dieta normolipídica baseada em óleo de linhaça, com ω -ratio alto tivesse ação anti-inflamatória. Entretanto, expressão de genes da resposta inflamatória foi heterogênea. A explicação plausível, até o momento, é de que este tipo de dieta favoreça a formação de hierarquias entre os animais, e determine diferentes níveis circulantes de testosterona (como indicado pela dispersão do peso dos testículos dos animais deste grupo experimental). Acrescente-se a isto, a presença de regiões de atrofia epitelial que foi característico deste grupo experimental. As associações entre estes parâmetros dependerá de

investigações futuras.

O que ficou claro a partir dos dados obtidos por RNAseq, é que os aspectos de inflamação encontrados às 32 semanas estão relacionados com a expressão de genes relacionados à inflamação resposta imune às 12 semanas. Esta observação sugere a existência de adaptação do órgão e que as prostatites podem ter programação de longo prazo. Tanto o padrão de expressão gênica prematura quanto as características das prostatites instaladas, podem revelar padrões que se associem à susceptibilidade a afecções tardias do órgão.

Finalmente, o padrão de citocinas e adipocinas observado às 32 semanas, ainda não estava definido à 12 semanas, para garantir que o padrão de expressão gênico relacionado a inflamação/resposta imune fosse ditado por elas. Isto nos faz acreditar que os perfis de ácidos graxos encontrados nas dietas desempenhem funções locais, conectando fatores do ambiente, no caso, nutricionais, com a expressão gênica da próstata. Faz-se destaque aos membros da família Toll-like mencionados acima.

Na idade adulta (32 semanas), a análise do transcriptoma dos animais tratados com dieta normolipídica ricas em gordura saturada (banha) revelou ontogenias associadas ao estresse de retículo endoplasmático (ER) e ativação da via da UPR (*Unfolding protein response*). O estresse do retículo endoplasmático pode levar à produção de mediadores pró-inflamatórios, via ativação de NFκB (MILANSKI et al., 2009; VELLOSO; FOLLI; SAAD, 2015). É possível que a combinação da expressão prematura de genes da resposta inflamatória, do padrão de citocinas inflamatórias sistêmicas e da sinalização pró-inflamatória desencadeada pelo estresse de retículo endoplasmático resulte na prostatite característica destes animais alimentados com banha quando atingem as 32 semanas.

Finalmente, pudemos demonstrar que várias das características peculiares à próstata de ratos (ESCOBAR; GOMES-MARCONDES; CARVALHO, 2009) e em camundongos (este trabalho) são reproduzidas em gerbilos da Mongólia. Este animal foi incluído em nossas análises por apresentar desvio metabólico para baixo consumo de água e alta dependência de oxidação de ácidos graxos para obtenção de água metabólica. De forma geral, as dietas resultaram em alterações similares. Entretanto, determinamos que estes animais não apresentam o padrão de crescimento bifásico encontrado em camundongos, quando alimentados com dieta

baseada banha. Lesões epiteliais foram encontradas já às 12 semanas e foram mais frequentes nos animais tratados com linhaça e banha.

VIII. CONCLUSÕES

- Dietas normolipídicas (7%) baseadas em óleo de linhaça, óleo de soja e banha de porco com perfis de ácidos graxos, particularmente caracterizados por diferentes proporções de ácidos graxos poli-insaturados e proporções ω -3/ ω -6 são importantes moduladores do crescimento corpóreo e da fisiologia prostática em pelo menos três espécies;
- A extensão do tempo de exposição a dietas normolipídicas (7%) com diferentes perfis de ácidos graxos salientou os aspectos observados em curtos períodos e causou inflamação (prostatites), hiperplasia epitelial e lesões pré-neoplásicas, particulares a cada uma delas;
- A qualidade dos ácido graxos em dietas normolipídicas influencia o crescimento, o ganho de peso e índice de adiposidade corporal, o acúmulo de gordura hepática, o metabolismo e a termogênese. A dieta baseada em óleo de soja promove o crescimento e acúmulo de gordura corporal. A dieta baseada em óleo de linhaça favorece a termogênese. A dieta baseada em banha de porco resulta em ganho de peso bifásico e menor índice de adiposidade corporal, quando comparado ao efeito daquela baseada em soja;
- Dietas normolipídicas com diferentes qualidades de ácidos graxos influenciam progressivamente o crescimento prostático e as relações volumétricas entre os diferentes compartimentos teciduais; em particular aquela baseada em óleo de linhaça resultou em atrofia epitelial; soja e banha causaram hiperplasia epitelial. Após 32 semanas, linhaça e banha resultaram na presença de infiltrados inflamatórios, caracterizando as prostatites;
- O perfil lipídico das dietas influenciou o transcriptoma da próstata ventral de camundongos, com destaque para a ativação das vias de inflamação e vias relacionadas ao estresse de retículo endoplasmático, respectivamente após 12 e 32 semanas de exposição às dietas baseadas em banha e linhaça.
- As três dietas afetam diferencialmente o ganho de peso corporal de Gerbilos da Mongólia, sem o padrão bifásico de crescimento promovido pela banha.

Curiosamente, o mesmo perfil de crescimento corporal é reproduzido no crescimento da próstata ventral, embora apenas a banha promova hiperplasia epitelial. Os infiltrados inflamatórios são focais, mas seguem o mesmo padrão observado em camundongos (presentes nas situações banha e linhaça). Já as lesões pre-neoplásicas foram mais frequentes na banha. Nestes animais, as lesões epiteliais apresentam associação com a existência de focos inflamatórios.

IX. BIBLIOGRAFIA

- ADUR, J. et al. Quantitative changes in human epithelial cancers and osteogenesis imperfecta disease detected using nonlinear multicontrast microscopy. **Journal of biomedical optics**, v. 17, n. 8, p. 81401–81407, ago. 2012.
- ALVHEIM, A. R. et al. Dietary Linoleic Acid Elevates Endogenous 2-AG and Anandamide and Induces Obesity. **Obesity**, v. 20, n. 10, p. 1984–1994, 2012.
- ATTARD, G. et al. Prostate cancer. **Lancet**, 11 jun. 2015.
- BERQUIN, I. M. et al. Polyunsaturated fatty acid metabolism in prostate cancer. **Cancer metastasis reviews**, v. 30, n. 3-4, p. 295–309, 2011.
- BERRY, S. J. et al. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. **The Journal of urology**, v. 132, n. 3, p. 474–479, 1984.
- BOOTH, F. W. et al. Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 88, n. 2, p. 774–787, 2000.
- BOOTH, F. W. et al. Waging war on modern chronic diseases : **Journal of Applied Physiology**, v. 88, p. 774–787, 2011.
- BRASKY, T. M. et al. Plasma phospholipid fatty acids and prostate cancer risk in the SELECT trial. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 15, p. 1132–41, 2013.
- BRAVI, F. et al. Macronutrients, fatty acids, cholesterol, and risk of benign prostatic hyperplasia. **Urology**, v. 67, n. 6, p. 1205–11, 2006.
- BRUNI-CARDOSO, A.; CARVALHO, H. F. Dynamics of the epithelium during canalization of the rat ventral prostate. **Anatomical Record**, v. 290, n. August 2006, p. 1223–1232, 2007.
- CHANG, R. T. M.; KIRBY, R.; CHALLACOMBE, B. J. **Is there a link between BPH and prostate cancer?**Practitioner. **Anais...**2012
- CHIVA-BLANCH, G.; BADIMON, L.; ESTRUCH, R. Latest evidence of the effects of the mediterranean diet in prevention of cardiovascular disease. **Current atherosclerosis reports**, v. 16, p. 446, 2014.
- CHO, H. et al. A High-Fat Diet Containing Lard Accelerates Prostate Cancer Progression and Reduces Survival Rate in Mice: Possible Contribution of Adipose

Tissue-Derived Cytokines. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2539–2561, 2015.

CHUA, M. E. et al. The relevance of serum levels of long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and prostate cancer risk: A meta-analysis. **Canadian Urological Association journal = Journal de l'Association des urologues du Canada**, v. 7, n. 5-6, p. E333–43, 2013.

CORDAIN, L. et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 2, p. 341–354, 2005.

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

CUNNANE, S. C. Human brain evolution: A question of solving key nutritional and metabolic constraints on mammalian brain development. In: **Human Brain Evolution: The Influence of Freshwater and Marine Food Resources**. [s.l: s.n.]. p. 33–64.

DE MARZO, A. M. et al. Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. **The American journal of pathology**, v. 153, n. 3, p. 911–919, 1998.

DEOL, P. et al. Soybean Oil Is More Obesogenic and Diabetogenic than Coconut Oil and Fructose in Mouse: Potential Role for the Liver. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0132672, 2015.

DONJACOUR, A. A.; THOMSON, A. A.; CUNHA, G. R. FGF-10 plays an essential role in the growth of the fetal prostate. **Developmental Biology**, v. 261, n. 1, p. 39–54, 2003.

EATON, S. B.; KONNER, M.; SHOSTAK, M. Stone agers in the fast lane: chronic degenerative diseases in evolutionary perspective. **The American journal of medicine**, v. 84, n. 4, p. 739–749, 1988.

EPSTEIN, M. M. et al. Dietary fatty acid intake and prostate cancer survival in Örebro county, Sweden. **American Journal of Epidemiology**, v. 176, n. 3, p. 240–252, 2012.

ESCOBAR, E. L. O.; GOMES-MARCONDES, M. C. C.; CARVALHO, H. F. Dietary fatty acid quality affects AR and PPAR?? levels and prostate growth. **Prostate**, v. 69,

n. November 2008, p. 548–558, 2009.

ESTRUCH, R. et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 14, p. 1279–90, 2013.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–86, 2014.

FURRIEL, A. et al. Diets Rich in Saturated and Polyunsaturated Fatty Acids Induce Morphological Alterations in the Rat Ventral Prostate. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e102876, 2014.

GARCÍA-FLÓREZ, M.; OLIVEIRA, C. A; CARVALHO, H. F. Early effects of estrogen on the rat ventral prostate. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 38, n. 4, p. 487–97, 2005.

GARG, M. L.; BLAKE, R. J.; WILLS, R. B. H. Macadamia Nut Consumption Lowers Plasma Total and LDL Cholesterol Levels in Hypercholesterolemic Men. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1060–1063, 2003.

GERHART-HINES, Z. et al. The nuclear receptor Rev-erba controls circadian thermogenic plasticity. **Nature**, v. 503, n. 7476, p. 410–3, 2013.

GRIEL, A. E. et al. A macadamia nut-rich diet reduces total and LDL-cholesterol in mildly hypercholesterolemic men and women. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 4, p. 761–767, 2008.

GRÖNBERG, H. Prostate cancer epidemiology. **The Lancet**, v. 361, n. 9360, p. 859–864, 2003.

GU, Z. et al. Mechanisms of omega-3 polyunsaturated fatty acids in prostate cancer prevention. **BioMed research international**, v. 2013, p. 824563, 2013.

HAAG, M. Essential fatty acids and the brain. **Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie**, v. 48, n. 3, p. 195–203, 2003.

HAYWARD, S. W. et al. Interactions between adult human prostatic epithelium and rat urogenital sinus mesenchyme in a tissue recombination model. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 63, n. 3, p. 131–40, 1998.

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

HUTTUNEN, E.; ROMPPANEN, T.; HELMINEN, H. J. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. **Journal of anatomy**, v. 132, n. Pt 3, p. 357–70, 1981.

HWANG, D. Modulation of the expression of cyclooxygenase-2 by fatty acids mediated through toll-like receptor 4-derived signaling pathways. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 14, p. 2556–2564, 2001.

KARTHAUS, W. R. et al. Identification of Multipotent Luminal Progenitor Cells in Human Prostate Organoid Cultures. **Cell**, v. 159, n. 1, p. 163–175, 2014.

KHEIRANDISH, P.; CHINEGWUNDOH, F. Ethnic differences in prostate cancer. **British journal of cancer**, v. 105, n. 4, p. 481–485, 2011.

KÖNNER, A. C.; BRÜNING, J. C. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 16–23, 2011.

KUIPERS, R. S.; JOORDENS, J. C. A.; MUSKIET, F. A. J. A multidisciplinary reconstruction of Palaeolithic nutrition that holds promise for the prevention and treatment of diseases of civilisation. **Nutrition Research Reviews**, v. 25, p. 96–129, 2012.

LABBÉ, D. P. et al. Role of diet in prostate cancer: the epigenetic link. **Oncogene**, n. August, p. 1–9, 2014.

LEE, C. et al. Prostatic ductal system in rats: regional variation in morphological and functional activities. **Biology of reproduction**, v. 43, n. 6, p. 1079–86, 1990.

LEE, J. et al. Cancer incidence among Korean-American immigrants in the United States and native Koreans in South Korea. **Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center**, v. 14, n. 1, p. 78–85, 2007.

LIU, H. Q. et al. A high ratio of dietary n-3/n-6 polyunsaturated fatty acids improves obesity-linked inflammation and insulin resistance through suppressing activation of TLR4 in SD rats. **Nutrition Research**, v. 33, n. 10, p. 849–858, 2013.

LIU, J. et al. Saturated fatty acids up-regulate COX-2 expression in prostate epithelial cells via toll-like receptor 4/NF-κB signaling. **Inflammation**, v. 37, n. 2, p. 467–77, 2014.

MADSEN, L.; PETERSEN, R. K.; KRISTIANSEN, K. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. **Biochimica et**

Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, v. 1740, n. 2, p. 266–286, 2005.

MANHEIMER, E. W. et al. Paleolithic nutrition for metabolic syndrome: systematic review and meta-analysis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 12 ago. 2015.

MARKER, P. C. et al. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental Biology**, v. 253, n. 2, p. 165–174, 2003.

MCNEAL, J. E. The zonal anatomy of the prostate. **The Prostate**, v. 2, n. 1, p. 35–49, 1981.

MCNEAL, J. E.; COMPANY, B. W. **The Prostate Gland, Morphology and Pathobiology**. [s.l.] Burroughs Wellcome Company, 1983.

MIDTBØ, L. K. et al. Intake of Farmed Atlantic Salmon Fed Soybean Oil Increases Insulin Resistance and Hepatic Lipid Accumulation in Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53094, 2013.

MILANSKI, M. et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 359–370, 2009.

NASCIMENTO, L. F. R. et al. Omega-3 fatty acids induce neurogenesis of predominantly POMC-expressing cells in the hypothalamus. **Diabetes**, out. 2015.

NEMETH, J. A; LEE, C. Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. **The Prostate**, v. 28, n. 2, p. 124–8, 1996.

O'KEEFE, J. H. et al. Achieving hunter-gatherer fitness in the 21st century: Back to the future. **American Journal of Medicine**, v. 123, n. 12, p. 1082–1086, 2010.

OHWAKI, K. et al. Relationship between Dietary Factors and Prostate-Specific Antigen in Healthy Men. **Urologia Internationalis**, v. 89, n. 3, p. 270–274, 2012.

ØRSTED, D. D.; BOJESSEN, S. E. The link between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **Nature reviews. Urology**, v. 10, n. 1, p. 49–54, 2013.

OUSSET, M. et al. Multipotent and unipotent progenitors contribute to prostate postnatal development. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 11, p. 2600, 2012.

PARKS, J. S.; RUDEL, L. L. Effect of Fish Oil on Atherosclerosis and Lipoprotein Metabolism. **Atherosclerosis**, v. 84, n. 2-3, p. 83–94, 1990.

PELEGATI, V. B. et al. **Multimodal optical setup for nonlinear and fluorescence**

lifetime imaging microscopies: improvement on a commercial confocal inverted microscope**Proc. SPIE**, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1117/12.909358>>

PELLIZZON, M. et al. Effects of dietary fatty acids and exercise on body-weight regulation and metabolism in rats. **Obesity research**, v. 10, n. 9, p. 947–55, 2002.

PISANI, D. F. et al. The ω 6-fatty acid, arachidonic acid, regulates the conversion of white to brite adipocyte through a prostaglandin/calcium mediated pathway. **Molecular metabolism**, v. 3, n. 9, p. 834–47, 2014.

POWERS, G. L.; MARKER, P. C. Recent advances in prostate development and links to prostatic diseases. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 5, n. 2, p. 243–256, 2013.

PRINS, G. S.; PUTZ, O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p. 641–659, 2008.

RIDER, J. R. et al. Tumor expression of adiponectin receptor 2 and lethal prostate cancer. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 6, p. 639–647, 1 jun. 2015.

ROSA-RIBEIRO, R. et al. Desquamation is a novel phenomenon for collective prostate epithelial cell deletion after castration. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 141, n. 2, p. 213–220, 2014.

RUSSO, G. L. Dietary n - 6 and n - 3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 6, p. 937–946, 2009.

SANDA, M. G. et al. Genetic susceptibility of benign prostatic hyperplasia. **The Journal of urology**, v. 152, n. 1, p. 115–9, 1994.

SHIMIZU, H. et al. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. **British journal of cancer**, v. 63, n. 6, p. 963–6, 1991.

SPENCER, L. et al. The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 12, p. 2077–2086, 2009.

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

- TAKAHASHI, Y.; IDE, T. Dietary n-3 fatty acids affect mRNA level of brown adipose tissue uncoupling protein 1, and white adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in the rat. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. 2, p. 175–184, 2000.
- TAMMA, S. M. et al. Influence of polyunsaturated fatty acids on urologic inflammation. **International urology and nephrology**, v. 47, n. 11, p. 1753–61, nov. 2015.
- TAYLOR, R. A; RISBRIDGER, G. P. The path toward identifying prostatic stem cells. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 76, n. 6, p. 671–681, 2008.
- TIMMS, B. G. Prostate development: A historical perspective. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p. 565–577, 2008.
- TREMBLAY, M. S. et al. Moving forward by looking back: lessons learned from long-lost lifestyles. **Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquée, nutrition et métabolisme**, v. 33, n. 4, p. 836–42, 2008.
- UKROPEC, J. et al. The hypotriglyceridemic effect of dietary n-3 FA is associated with increased beta-oxidation and reduced leptin expression. **Lipids**, v. 38, n. 10, p. 1023–1029, 2003.
- UNTERGASSER, G.; MADERSBACHER, S.; BERGER, P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. **Experimental gerontology**, v. 40, n. 3, p. 121–8, 2005.
- VELLOSO, L. A.; FOLLI, F.; SAAD, M. J. TLR4 at the crossroads of nutrients, gut microbiota and metabolic inflammation. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 3, p. 245–271, 2015.
- VILAMAIOR, P. S. L.; TABOGA, S. R.; CARVALHO, H. F. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: A stereological and morphometrical study. **Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 288, n. 8, p. 885–892, 2006.
- WILHELM, D.; KOOPMAN, P. The makings of maleness: towards an integrated view of male sexual development. **Nature reviews. Genetics**, v. 7, n. 8, p. 620–631, 2006.
- ZADRA, G.; PHOTOPOULOS, C.; LODA, M. The fat side of prostate cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 10, p. 1518–1532, 2013.

X. TABELAS E FIGURAS SUPLEMENTARES

Tabela S1. Análise da físico química das experimentais AIN93-G

Componentes	LO	SO	PF
Total (g)	100g	100g	100g
Lipídeos (g/100g)	7,22± 0,05	7,25± 0,11	7,03± 0,14
Carboidratos (g/100g)	65,78± 0,09	65,71± 0,10	65,69± 0,08
Proteínas (g/100g)	15,48± 0,40	15,62± 0,14	15,85± 0,03
Calorias (kcal/100g)	390,0± 0,07	391,0± 0,07	389,0± 0,09
Umidade (g/100g)	7,55± 0,15	7,51± 0,10	7,46± 0,18
Cinzas (g/100g)	3,97± 0,07	3,91± 0,12	3,97± 0,09

SO, Óleo de Soja; LO, Óleo de Linhaça; PF, Banha de Porco.

Tabela S2 . Composição de ácidos graxos dos óleos utilizados nas dietas experimentais, conforme análise realizada por cromatografia gasosa.

Ácidos graxos	LO (%)	SO (%)	PF (%)
C6:0	0.06	0.07	0.07
C8:0	0.05	0.05	0.06
C10:0	0.32	0.32	0.34
C12:0	0.12	0.14	0.22
C14:0	0.48	0.54	1.89
C15:0	0.12	0.09	0.15
C16:0	8.41	12.18	26.51
C17:0	0.18	0.16	0.52
C18:0	4.24	5.33	14.84
C20:0	0.15	0.48	0.22
C22:0	0.17	0.51	0.05
C24:0	0.15	0.24	0.07
Σ SFA	14.45	20.11	44.94
C16:1 ω7	0.25	0.25	2.31
C17:1 ω9	0.06	0.06	0.43
C18:1 ω9	17.27	26.7	38.38
C18:1 trans ω9	0.45	-	0.23
C20:1 ω9	0.15	0.21	0.6
Σ MUFA	18.18	27.22	41.95
C18:2 ω6	14.32	47.14	12.22
C18:2 trans ω6	0.07	0.47	-
C18:3 ω3	52.71	4.32	0.81
C18:3 trans ω3	0.26	0.74	0.07
Σ PUFA	67.36	52.67	13.1
Σ ω6	14.39	47.61	12.22
Σ ω3	52.97	5.06	0.88
Razão ω3/ω6	3.7:1	0.11:1	0.07:1

SO: Óleo de Soja; LO: Óleo de Linhaça; PF: Banha de Porco.

Figura Suplementar 1

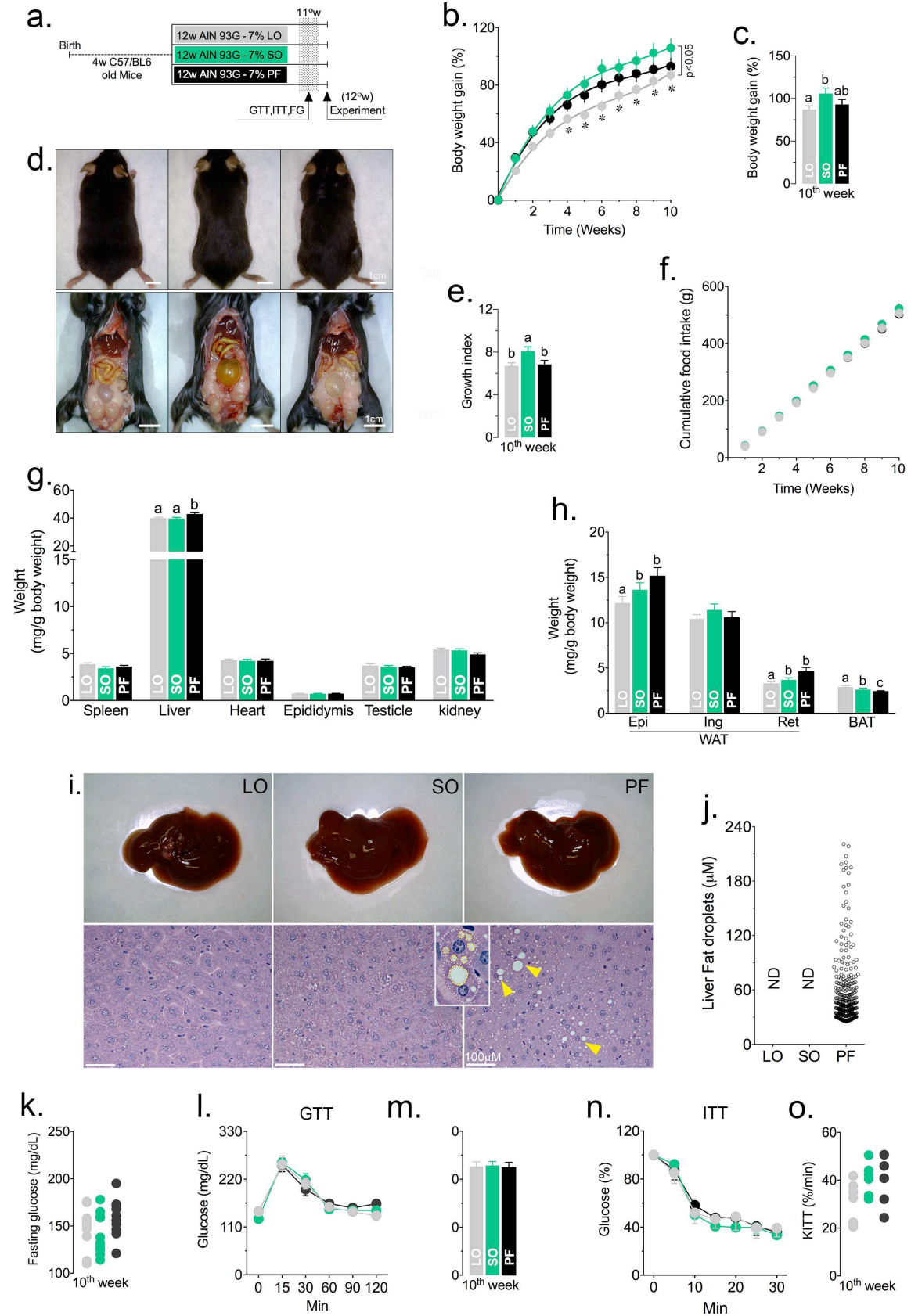


Figura Suplementar 1. Alterações fenotípicas e metabólicas ocasionadas pela manipulação do perfil lipídico dietético. Camundongos C57/BL6 foram submetidos à dietas normolipídicas com diferentes perfis lipídicos durante o período de 12 semanas como descrito em (a). O ganho de massa corporal (b,c), o índice de crescimento (d,e) e o consumo dietético foram avaliados semanalmente (f). Na 11ª semana, previamente ao término do período experimental a concentração de glicose plasmática em jejum (k) foi mensurada e os animais submetidos ao teste de tolerância à glicose (l, valores médios de glicose; m, área sob a curva) e tolerância a insulina (n, valores médios de glicose plasmática; o, constante de decaimento). Após uma semana, os animais foram sacrificados, os órgãos (f) foram coletados, pesados e armazenados ou ainda processados histologicamente. Os órgãos que apresentaram alterações macroscópicas como o fígado foram analisados através da coloração de HE (i,j). Em todas as análises n=6 (i-o) a 12 (a-h); diferentes letras e * : p<0.05.

Dietas ricas em ω 3 (LO) resultam em menor crescimento, acúmulo de gordura corporal e hepática. Camundongos C57/BL6 randomicamente divididos em três grupos foram alimentados com dietas normolipídicas (**Tabela 1**), compostas por ácidos graxos poliinsaturados provenientes do óleo de linhaça (LO; razão ω 3/ ω 6 = 4:1) e óleo de soja (SO; razão ω 3/ ω 6 = 1:9) e, por ácidos graxos saturados provenientes da banha de porco (PF), conforme a análise de óleos realizada por cromatografia gasosa (**Tabela S2**), durante o período de 12 semanas como descrito em (a). Em doze semanas, os animais alimentados com dietas ricas em ω 3 (LO) apresentaram menor ganho de massa corporal (b,c) e índice de crescimento (d-e), reduzido acúmulo de gordura (h), fígado com histologia preservada, sem sinais de Esteatose hepática (i,j). Apesar do perfil lipídico, os animais não apresentaram alterações na glicose plasmática em jejum (k) e nos testes de tolerância a glicose e a insulina (l-o). Embora a dieta SO resultou em maior ganho de massa corporal e acúmulo de gordura quando comparado ao grupo LO, o início de quadro Esteatose foi verificado apenas no grupo PF.

Figura Suplementar 2

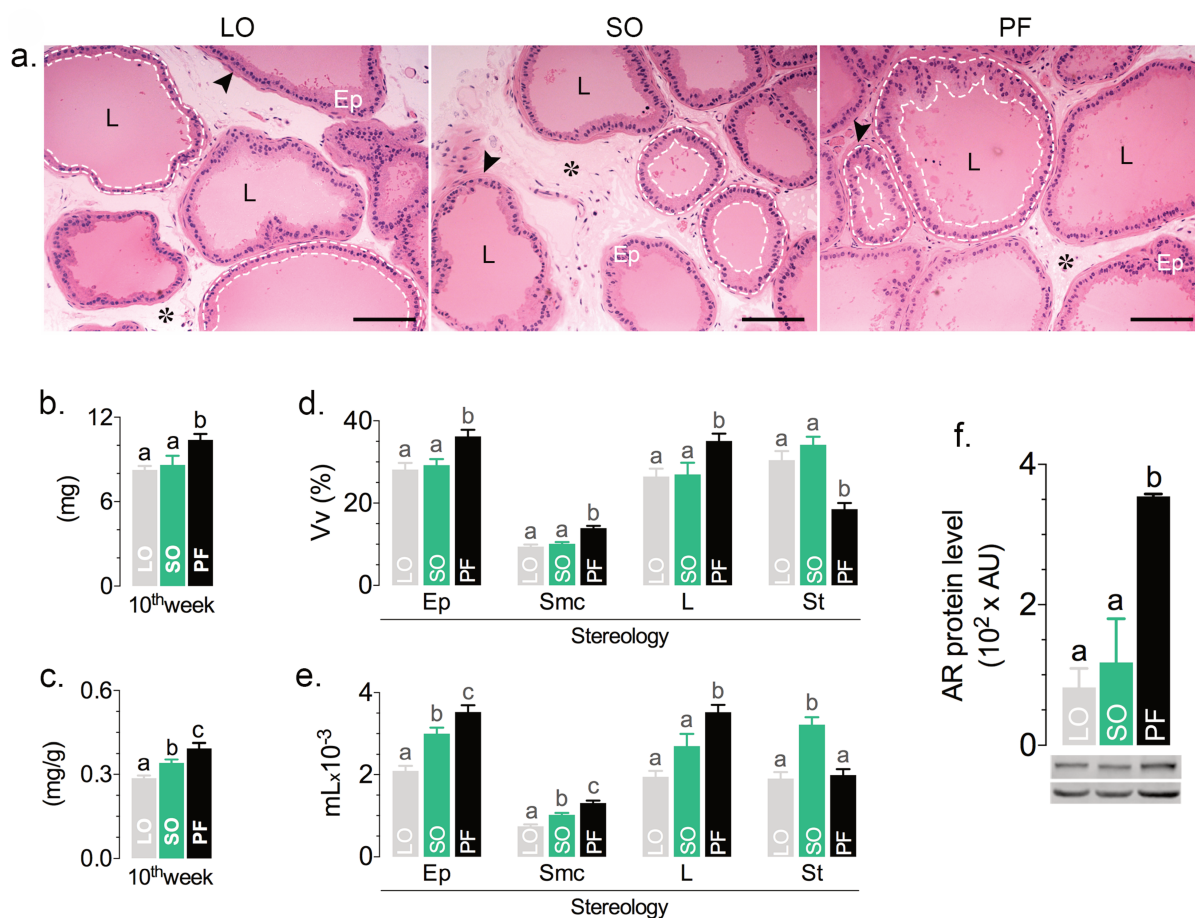


Figura Suplementar 2: Dietas compostas por diferentes perfis lipídicos modulam o crescimento da glândula prostática. Camundongos C57/BL6 submetidos à uma das dietas conforme descrito na **Figura Suplementar 1a** foram sacrificados ao final do período experimental, o sangue foi coletado, a próstata dissecada e o peso relativo (**b**) e absoluto (**c**) aferido, posteriormente a próstata foi submetida a análise histológica através da coloração de HE. As alterações nas estruturas teciduais (**a**) foram avaliadas por estereologia, em função da variação do volume relativo (**d**) e absoluto (**e**) dos compartimentos: epitelial (**Ep**), luminal (**L**), estromal (*) e do conteúdo de células musculares lisas (**cabeça de seta**) na próstata ventral (VP) dos camundongos. O conteúdo proteico do receptor de andrógeno foi avaliado por western blot. Em todas as análises n=5 (WB) a 6 (histologia); letras diferentes: p<0,05.

Dietas ricas em ácidos graxos saturados promovem maior crescimento da próstata, enquanto animais alimentados com $\omega 3$ e, em menor proporção $\omega 6$, apresentam menor crescimento do compartimento epitelial e da glândula prostática. Embora os experimentos anteriores indiquem que as dietas ricas em $\omega 6$ (SO) promovem maior crescimento e ganho de massa corporal (**Figura suplementar 1.b,c**), as dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados, em menor magnitude o $\omega 6$, resultaram em menor crescimento da próstata (**b,c**) e do compartimento epitelial (**d,e**). Já a gordura saturada induz o aumento das células musculares lisas e compartimento epitelial (**d,e**), além do crescimento da glândula prostática, supõe-se que mediado pela atividade do receptor de andrógeno (**f**). Embora o crescimento da glândula seja modulada pelo perfil lipídico, em 12 semanas de tratamento não foram observadas alterações no compartimento luminal e presença e frequência de células do sistema imune na próstata.

Figura Suplementar 3

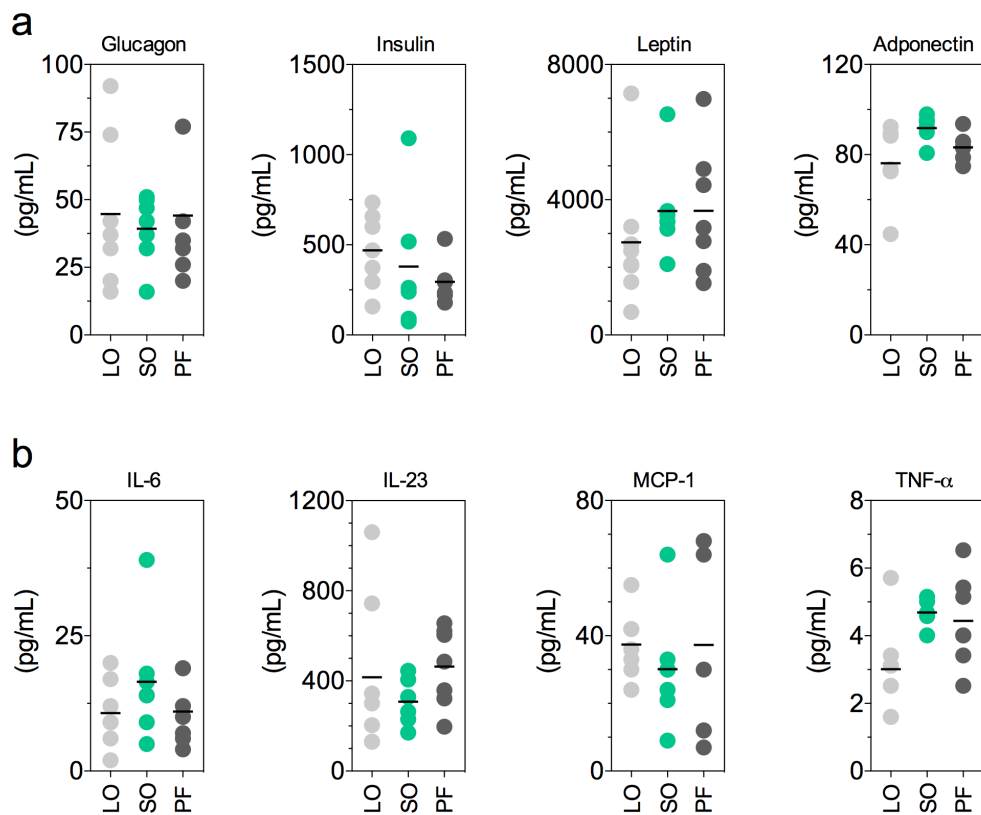


Figura Suplementar 3: Alterações no perfil de hormônios e citocinas plasmáticas ocasionadas pela manipulação do perfil lipídico dietético. Camundongos C57/BL6 submetidos à diferentes dietas conforme descrito na **Figura Suplementar 1a** foram sacrificados ao final do período experimental, o sangue foi coletado e posteriormente analisado o perfil sérico de hormônios (**a**) e de citocinas pró-inflamatórias em resposta a modulação do perfil lipídico dietético. Em todos as análises n=7.

XI. ANEXOS

ANEXO 1 – Lista de genes diferencialmente expressos em animais tratados por doze semanas com dieta baseada em banha de porco quando comparado aos animais tratados com dieta baseada em óleo de soja. P-adj: 0,10.

Ensembl Gene ID	Gene Symbol	Gene Name	Log2FC	FC	p-value	p-adj
ENSMUSG00000094088	Ighv1-64	immunoglobulin heavy variable 1-64	2.69	6.47	2.1E-06	2.5E-03
ENSMUSG00000043613	Mmp3	matrix metalloproteinase 3	2.59	6.02	1.6E-05	4.7E-03
ENSMUSG00000009185	Ccl8	chemokine (C-C motif) ligand 8	2.41	5.30	8.6E-06	4.0E-03
ENSMUSG00000095571	Ighv5-17	immunoglobulin heavy variable 5-17	2.35	5.08	1.2E-04	1.7E-02
ENSMUSG00000032094	Cd3d	CD3 antigen, delta polypeptide	2.34	5.07	1.2E-06	2.2E-03
ENSMUSG00000031779	Ccl22	chemokine (C-C motif) ligand 22	2.25	4.77	1.4E-06	2.2E-03
ENSMUSG00000037944	Ccr7	chemokine (C-C motif) receptor 7	2.14	4.41	5.6E-05	1.0E-02
ENSMUSG00000076608	Igkj5	immunoglobulin kappa joining 5	2.12	4.36	1.2E-04	1.7E-02
ENSMUSG00000079012	Serpina3m	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3M	2.12	4.34	2.4E-05	5.9E-03
ENSMUSG00000047592	Nxpe5	neurexophilin and PC-esterase domain family, member 5	2.11	4.31	2.4E-05	5.9E-03
ENSMUSG00000039013	Siglecf	sialic acid binding Ig-like lectin F	2.10	4.28	1.9E-04	2.4E-02
ENSMUSG00000040899	Ccr6	chemokine (C-C motif) receptor 6	2.02	4.06	1.3E-03	7.5E-02
ENSMUSG00000074445	Sprr2a3	small proline-rich protein 2A3	1.96	3.88	2.0E-03	9.4E-02
ENSMUSG00000041481	Serpina3g	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G	1.91	3.77	1.1E-05	4.2E-03
ENSMUSG00000076677	Ighv6-3	immunoglobulin heavy variable 6-3	1.90	3.74	1.7E-03	8.6E-02
ENSMUSG00000021702	Thbs4	thrombospondin 4	1.89	3.70	6.6E-05	1.1E-02
ENSMUSG00000034833	Tespa1	thymocyte expressed, positive selection associated 1	1.83	3.56	3.8E-05	8.0E-03
ENSMUSG00000026866	Kynu	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	1.81	3.50	1.6E-03	8.5E-02
ENSMUSG00000095771	Igkv14-111	immunoglobulin kappa variable 14-111	1.79	3.47	6.0E-05	1.1E-02
ENSMUSG00000058755	Osm	oncostatin M	1.79	3.46	5.9E-04	4.8E-02
ENSMUSG00000074677	Sirpb1c	signal-regulatory protein beta 1C	1.74	3.34	1.9E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000076619	Ighj3	immunoglobulin heavy joining 3	1.74	3.34	1.4E-03	7.9E-02
ENSMUSG00000093809	Bcl2a1a	B cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a	1.72	3.28	6.0E-04	4.8E-02
ENSMUSG00000043740	B430306N03Rik	RIKEN cDNA B430306N03 gene	1.70	3.25	2.1E-04	2.5E-02
ENSMUSG00000056290	Ms4a4b	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4B	1.69	3.23	1.1E-04	1.7E-02
ENSMUSG00000021091	Serpina3n	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N	1.68	3.21	2.0E-04	2.5E-02

ENSMUSG00000038421	Fcrla	Fc receptor-like A	1.67	3.18	5.1E-04	4.4E-02
ENSMUSG00000024679	Ms4a6d	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6D	1.66	3.15	6.2E-07	1.7E-03
ENSMUSG00000026581	Sell	selectin, lymphocyte	1.63	3.10	2.0E-03	9.5E-02
ENSMUSG00000029082	Bst1	bone marrow stromal cell antigen 1	1.63	3.09	1.3E-05	4.6E-03
ENSMUSG00000003882	Il7r	interleukin 7 receptor	1.62	3.08	3.3E-04	3.3E-02
ENSMUSG00000027514	Zbp1	Z-DNA binding protein 1	1.61	3.06	1.4E-03	7.9E-02
ENSMUSG00000076490	Trbc1	T cell receptor beta, constant region 1	1.60	3.03	2.7E-04	3.0E-02
ENSMUSG00000021922	Itih4	inter alpha-trypsin inhibitor, heavy chain 4	1.60	3.03	8.4E-04	5.9E-02
ENSMUSG00000047798	Cd300lf	CD300 antigen like family member F	1.60	3.02	1.3E-04	1.8E-02
ENSMUSG00000062939	Stat4	signal transducer and activator of transcription 4	1.59	3.01	4.9E-06	3.2E-03
ENSMUSG00000041538	H2-Ob	histocompatibility 2, O region beta locus	1.58	3.00	9.3E-04	6.3E-02
ENSMUSG00000015314	Slamf6	SLAM family member 6	1.58	2.99	1.4E-03	7.9E-02
ENSMUSG00000030156	Cd69	CD69 antigen	1.58	2.99	1.9E-03	9.0E-02
ENSMUSG00000076498	Trbc2	T cell receptor beta, constant 2	1.57	2.98	9.6E-04	6.4E-02
ENSMUSG00000035373	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	1.56	2.95	5.4E-05	1.0E-02
ENSMUSG00000097352	C920009B18Rik	RIKEN cDNA C920009B18 gene	1.55	2.93	1.4E-03	7.9E-02
ENSMUSG00000071714	Csf2rb2	colony stimulating factor 2 receptor, beta 2, low-affinity (granulocyte-	1.54	2.90	2.2E-06	2.5E-03
ENSMUSG00000050921	P2ry10	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 10	1.53	2.90	4.4E-04	4.2E-02
ENSMUSG00000087107	Al662270	expressed sequence Al662270	1.53	2.88	6.3E-05	1.1E-02
ENSMUSG00000027398	Il1b	interleukin 1 beta	1.52	2.88	4.4E-04	4.2E-02
ENSMUSG00000020395	Itk	IL2 inducible T cell kinase	1.52	2.87	1.7E-04	2.3E-02
ENSMUSG00000060550	H2-Q7	histocompatibility 2, Q region locus 7	1.50	2.82	1.2E-04	1.8E-02
ENSMUSG00000026068	Il18rap	interleukin 18 receptor accessory protein	1.50	2.82	1.4E-04	1.9E-02
ENSMUSG00000002204	Napsa	napsin A aspartic peptidase	1.48	2.80	2.8E-04	3.1E-02
ENSMUSG00000071552	Tigit	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains	1.48	2.79	1.9E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000064147	Rab44	RAB44, member RAS oncogene family	1.47	2.77	2.7E-04	3.0E-02
ENSMUSG00000048621	Gm6377	predicted gene 6377	1.45	2.74	8.1E-04	5.9E-02
ENSMUSG00000027863	Cd2	CD2 antigen	1.45	2.74	7.4E-04	5.5E-02
ENSMUSG00000034438	Gbp8	guanylate-binding protein 8	1.45	2.73	1.9E-04	2.5E-02
ENSMUSG00000030167	Klrc1	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1	1.45	2.73	1.4E-03	7.9E-02
ENSMUSG00000022504	Ciita	class II transactivator	1.45	2.73	2.0E-05	5.3E-03
ENSMUSG00000050592	Fam78a	family with sequence similarity 78, member A	1.44	2.71	1.2E-04	1.7E-02

ENSMUSG00000004707	Ly9	lymphocyte antigen 9	1.44	2.71	1.2E-04	1.8E-02
ENSMUSG00000073409	H2-Q6	histocompatibility 2, Q region locus 6	1.44	2.71	2.8E-04	3.1E-02
ENSMUSG00000028071	Sh2d2a	SH2 domain containing 2A	1.43	2.70	6.5E-04	5.0E-02
ENSMUSG00000022876	Samsn1	SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals, 1	1.42	2.67	5.4E-04	4.6E-02
ENSMUSG00000037548	H2-DMb2	histocompatibility 2, class II, locus Mb2	1.42	2.67	1.0E-03	6.5E-02
ENSMUSG00000025044	Msr1	macrophage scavenger receptor 1	1.41	2.66	1.1E-04	1.7E-02
ENSMUSG00000034634	Ly6d	lymphocyte antigen 6 complex, locus D	1.41	2.65	4.4E-04	4.2E-02
ENSMUSG00000000682	Cd52	CD52 antigen	1.41	2.65	4.3E-06	3.2E-03
ENSMUSG00000054555	Adam12	a disintegrin and metallopeptidase domain 12 (meltrin alpha)	1.40	2.64	1.7E-03	8.6E-02
ENSMUSG00000071713	Csf2rb	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-	1.40	2.64	7.1E-07	1.7E-03
ENSMUSG00000027843	Ptpn22	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)	1.39	2.63	1.9E-05	5.1E-03
ENSMUSG00000024677	Ms4a6b	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B	1.38	2.60	5.7E-06	3.4E-03
ENSMUSG00000055413	H2-Q5	histocompatibility 2, Q region locus 5	1.38	2.60	5.0E-04	4.4E-02
ENSMUSG00000042842	Serpinc6b	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6b	1.37	2.59	3.2E-05	7.2E-03
ENSMUSG00000038179	Slamf7	SLAM family member 7	1.37	2.58	2.4E-04	2.8E-02
ENSMUSG00000017652	Cd40	CD40 antigen	1.36	2.57	7.6E-05	1.3E-02
ENSMUSG00000072596	Ear2	eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 2	1.35	2.54	1.6E-03	8.4E-02
ENSMUSG00000063193	Cd300lb	CD300 antigen like family member B	1.34	2.53	3.4E-04	3.4E-02
ENSMUSG00000029254	Stap1	signal transducing adaptor family member 1	1.34	2.53	1.1E-03	6.9E-02
ENSMUSG00000018927	Ccl6	chemokine (C-C motif) ligand 6	1.34	2.53	4.6E-04	4.2E-02
ENSMUSG00000031506	Ptpn7	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 7	1.33	2.52	1.4E-05	4.7E-03
ENSMUSG00000010142	Tnfrsf13b	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13b	1.33	2.51	2.2E-03	1.0E-01
ENSMUSG00000051506	Wdfy4	WD repeat and FYVE domain containing 4	1.33	2.51	1.5E-06	2.2E-03
ENSMUSG00000044703	Phf11a	PHD finger protein 11A	1.33	2.51	6.3E-04	4.9E-02
ENSMUSG00000030214	Plbd1	phospholipase B domain containing 1	1.32	2.50	1.4E-06	2.2E-03
ENSMUSG00000020437	Myo1g	myosin IG	1.32	2.49	2.4E-06	2.5E-03
ENSMUSG00000022372	Sla	src-like adaptor	1.32	2.49	1.8E-05	5.0E-03
ENSMUSG00000037280	Galnt6	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide	1.32	2.49	8.4E-04	5.9E-02
ENSMUSG00000043832	Clec4a3	C-type lectin domain family 4, member a3	1.31	2.48	5.6E-04	4.6E-02
ENSMUSG00000025473	Adam8	a disintegrin and metallopeptidase domain 8	1.31	2.48	1.2E-05	4.2E-03
ENSMUSG00000056145	AI504432	expressed sequence AI504432	1.31	2.48	4.0E-05	8.1E-03
ENSMUSG00000060509	Xcr1	chemokine (C motif) receptor 1	1.30	2.47	1.8E-04	2.4E-02

ENSMUSG00000030798	Cd37	CD37 antigen	1.30	2.47	3.9E-04	3.8E-02
ENSMUSG00000003283	Hck	hemopoietic cell kinase	1.29	2.45	5.1E-05	9.6E-03
ENSMUSG000000051998	Lax1	lymphocyte transmembrane adaptor 1	1.29	2.45	9.3E-04	6.3E-02
ENSMUSG000000031101	Sash3	SAM and SH3 domain containing 3	1.29	2.44	1.2E-04	1.7E-02
ENSMUSG000000039783	Kmo	kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)	1.28	2.43	1.7E-03	8.7E-02
ENSMUSG000000079227	Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5	1.28	2.43	2.3E-08	3.9E-04
ENSMUSG000000054293	A630033H20Rik	RIKEN cDNA A630033H20 gene	1.28	2.42	1.7E-03	8.6E-02
ENSMUSG000000038147	Cd84	CD84 antigen	1.27	2.42	1.9E-05	5.1E-03
ENSMUSG000000040747	Cd53	CD53 antigen	1.27	2.42	4.4E-06	3.2E-03
ENSMUSG000000030149	Klrk1	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1	1.27	2.42	1.6E-03	8.4E-02
ENSMUSG000000036381	P2ry14	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	1.27	2.41	2.0E-03	9.5E-02
ENSMUSG000000052142	Rasa1	RAS protein activator like 3	1.27	2.40	2.8E-04	3.1E-02
ENSMUSG000000026656	Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	1.26	2.39	1.0E-05	4.2E-03
ENSMUSG000000030148	Clec4a2	C-type lectin domain family 4, member a2	1.25	2.38	2.2E-04	2.7E-02
ENSMUSG000000015947	Fcgr1	Fc receptor, IgG, high affinity I	1.25	2.38	1.4E-05	4.7E-03
ENSMUSG000000078920	Ifi47	interferon gamma inducible protein 47	1.25	2.38	8.4E-04	5.9E-02
ENSMUSG000000008318	Relt	RELTL tumor necrosis factor receptor	1.25	2.38	2.9E-04	3.2E-02
ENSMUSG000000022439	Parvg	parvin, gamma	1.25	2.37	1.5E-05	4.7E-03
ENSMUSG000000019122	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9	1.25	2.37	9.0E-05	1.5E-02
ENSMUSG000000030830	Itgal	integrin alpha L	1.25	2.37	2.4E-04	2.8E-02
ENSMUSG000000024737	Slc15a3	solute carrier family 15, member 3	1.24	2.37	2.1E-05	5.5E-03
ENSMUSG000000037318	Traf3ip3	TRAF3 interacting protein 3	1.24	2.37	1.4E-03	7.9E-02
ENSMUSG000000003484	Cyp4f18	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 18	1.24	2.36	1.3E-03	7.5E-02
ENSMUSG000000051212	Gpr183	G protein-coupled receptor 183	1.24	2.36	1.5E-04	2.1E-02
ENSMUSG000000001588	Acap1	ArfGAP with coiled-coil, ankyrin repeat and PH domains 1	1.24	2.36	1.3E-03	7.5E-02
ENSMUSG000000034116	Vav1	vav 1 oncogene	1.23	2.35	2.8E-06	2.5E-03
ENSMUSG000000020077	Srgn	serglycin	1.23	2.35	4.3E-06	3.2E-03
ENSMUSG000000024965	Fermt3	fermitin family homolog 3 (Drosophila)	1.23	2.35	1.1E-05	4.2E-03
ENSMUSG000000028874	Fgr	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (Fgr) oncogene homolog	1.23	2.35	5.7E-04	4.7E-02
ENSMUSG000000024798	Htr7	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7	1.23	2.34	2.2E-03	1.0E-01
ENSMUSG000000021886	Gpr65	G-protein coupled receptor 65	1.23	2.34	2.8E-07	1.6E-03
ENSMUSG000000052760	A630001G21Ri	RIKEN cDNA A630001G21 gene	1.23	2.34	2.2E-04	2.6E-02

ENSMUSG00000074570	Cass4	Cas scaffolding protein family member 4	1.22	2.34	1.3E-03	7.6E-02
ENSMUSG00000040950	Mgl2	macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 2	1.22	2.33	3.9E-05	8.0E-03
ENSMUSG00000031304	Il2rg	interleukin 2 receptor, gamma chain	1.22	2.33	7.5E-04	5.6E-02
ENSMUSG00000026395	Ptpcr	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	1.22	2.33	8.8E-06	4.0E-03
ENSMUSG00000068129	Cst7	cystatin F (leukocystatin)	1.22	2.32	1.2E-03	7.2E-02
ENSMUSG00000021457	Syk	spleen tyrosine kinase	1.21	2.32	4.4E-05	8.4E-03
ENSMUSG00000002699	Lcp2	lymphocyte cytosolic protein 2	1.21	2.31	1.6E-05	4.7E-03
ENSMUSG00000045763	Basp1	brain abundant, membrane attached signal protein 1	1.21	2.31	2.1E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000021322	Aoah	acyloxyacyl hydrolase	1.21	2.31	9.0E-06	4.0E-03
ENSMUSG00000049744	Arhgap15	Rho GTPase activating protein 15	1.21	2.31	9.8E-05	1.6E-02
ENSMUSG00000033220	Rac2	RAS-related C3 botulinum substrate 2	1.20	2.30	2.1E-04	2.6E-02
ENSMUSG00000021880	Rnase6	ribonuclease, RNase A family, 6	1.20	2.29	1.6E-03	8.5E-02
ENSMUSG00000033777	Tlr13	toll-like receptor 13	1.20	2.29	3.5E-05	7.6E-03
ENSMUSG00000015355	Cd48	CD48 antigen	1.20	2.29	7.0E-07	1.7E-03
ENSMUSG00000038642	Ctss	cathepsin S	1.19	2.29	2.9E-06	2.5E-03
ENSMUSG00000018168	Ikarf3	IKAROS family zinc finger 3	1.19	2.28	5.8E-04	4.7E-02
ENSMUSG00000071715	Ncf4	neutrophil cytosolic factor 4	1.18	2.27	2.8E-05	6.5E-03
ENSMUSG00000001281	Itgb7	integrin beta 7	1.18	2.27	8.4E-04	5.9E-02
ENSMUSG00000039232	Stx11	syntaxin 11	1.18	2.26	4.0E-04	3.9E-02
ENSMUSG00000035273	Hpse	heparanase	1.17	2.25	1.1E-03	6.9E-02
ENSMUSG00000079293	Clec7a	C-type lectin domain family 7, member a	1.16	2.24	6.2E-04	4.9E-02
ENSMUSG00000048163	Selpg	selectin, platelet (p-selectin) ligand	1.16	2.23	1.5E-05	4.7E-03
ENSMUSG00000078921	Tgtp2	T cell specific GTPase 2	1.16	2.23	1.2E-03	7.4E-02
ENSMUSG00000000290	Itgb2	integrin beta 2	1.16	2.23	2.9E-05	6.8E-03
ENSMUSG00000044827	Tlr1	toll-like receptor 1	1.15	2.22	8.4E-04	5.9E-02
ENSMUSG00000016756	Cmah	cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase	1.15	2.22	4.7E-04	4.4E-02
ENSMUSG00000031264	Btk	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	1.14	2.21	1.3E-03	7.6E-02
ENSMUSG00000030745	Il21r	interleukin 21 receptor	1.14	2.21	1.1E-03	7.1E-02
ENSMUSG00000030707	Coro1a	coronin, actin binding protein 1A	1.14	2.21	2.4E-04	2.8E-02
ENSMUSG00000024397	Aif1	allograft inflammatory factor 1	1.14	2.21	9.6E-06	4.1E-03
ENSMUSG00000073421	H2-Ab1	histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	1.14	2.21	6.6E-06	3.5E-03
ENSMUSG00000021423	Ly86	lymphocyte antigen 86	1.14	2.20	1.7E-06	2.3E-03

ENSMUSG00000029204	Rhoh	ras homolog gene family, member H	1.14	2.20	9.8E-04	6.5E-02
ENSMUSG00000054435	Gimap4	GTPase, IMAP family member 4	1.13	2.19	9.1E-05	1.5E-02
ENSMUSG00000047631	Apof	apolipoprotein F	1.13	2.19	1.1E-05	4.2E-03
ENSMUSG00000035352	Ccl12	chemokine (C-C motif) ligand 12	1.13	2.19	2.9E-04	3.2E-02
ENSMUSG00000049988	Lrrc25	leucine rich repeat containing 25	1.12	2.18	5.0E-04	4.4E-02
ENSMUSG00000048865	Arhgap30	Rho GTPase activating protein 30	1.12	2.18	3.8E-05	8.0E-03
ENSMUSG00000070691	Runx3	runt related transcription factor 3	1.12	2.17	1.5E-04	2.0E-02
ENSMUSG00000048521	Cxcr6	chemokine (C-X-C motif) receptor 6	1.12	2.17	4.8E-04	4.4E-02
ENSMUSG00000026832	Cytip	cytohesin 1 interacting protein	1.12	2.17	5.0E-04	4.4E-02
ENSMUSG00000040522	Tlr8	toll-like receptor 8	1.12	2.17	9.6E-04	6.4E-02
ENSMUSG00000025161	Slc16a3	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3	1.11	2.17	9.8E-04	6.5E-02
ENSMUSG00000074785	Plxnc1	plexin C1	1.11	2.16	2.2E-05	5.5E-03
ENSMUSG00000020120	Plek	pleckstrin	1.11	2.16	5.5E-06	3.4E-03
ENSMUSG00000031662	Snx20	sorting nexin 20	1.11	2.16	9.5E-04	6.4E-02
ENSMUSG00000026271	Gpr35	G protein-coupled receptor 35	1.11	2.15	1.5E-03	8.0E-02
ENSMUSG00000015950	Ncf1	neutrophil cytosolic factor 1	1.10	2.15	1.6E-05	4.7E-03
ENSMUSG00000015396	Cd83	CD83 antigen	1.10	2.14	1.3E-03	7.5E-02
ENSMUSG00000002033	Cd3g	CD3 antigen, gamma polypeptide	1.10	2.14	1.2E-03	7.2E-02
ENSMUSG00000027009	Itga4	integrin alpha 4	1.10	2.14	6.1E-04	4.8E-02
ENSMUSG00000034028	Cd226	CD226 antigen	1.10	2.14	4.8E-04	4.4E-02
ENSMUSG00000036594	H2-Aa	histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	1.10	2.14	7.1E-06	3.7E-03
ENSMUSG00000089672	Gp49a	glycoprotein 49 A	1.09	2.14	1.5E-05	4.7E-03
ENSMUSG00000020901	Pik3r5	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5, p101	1.09	2.13	1.2E-05	4.2E-03
ENSMUSG00000029925	Tbxas1	thromboxane A synthase 1, platelet	1.09	2.13	9.3E-06	4.0E-03
ENSMUSG00000024610	Cd74	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex)	1.09	2.13	1.1E-05	4.2E-03
ENSMUSG00000027322	Siglec1	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	1.08	2.12	1.0E-03	6.6E-02
ENSMUSG00000024300	Myo1f	myosin IF	1.08	2.12	6.0E-06	3.4E-03
ENSMUSG00000063286	Gm8995	predicted gene 8995	1.08	2.11	7.2E-04	5.4E-02
ENSMUSG00000079419	Ms4a6c	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6C	1.07	2.11	5.1E-04	4.4E-02
ENSMUSG00000078771	Evi2a	ecotropic viral integration site 2a	1.07	2.10	5.4E-04	4.6E-02
ENSMUSG00000030165	Klrd1	killer cell lectin-like receptor, subfamily D, member 1	1.07	2.10	6.6E-04	5.1E-02
ENSMUSG00000000486	Sept1	septin 1	1.07	2.09	3.2E-04	3.3E-02

ENSMUSG00000060586	H2-Eb1	histocompatibility 2, class II antigen E beta	1.07	2.09	2.6E-05	6.1E-03
ENSMUSG00000037860	Aim2	absent in melanoma 2	1.06	2.09	2.4E-04	2.8E-02
ENSMUSG00000037872	Ackr1	atypical chemokine receptor 1 (Duffy blood group)	1.06	2.08	1.7E-03	8.6E-02
ENSMUSG00000022831	Hcls1	hematopoietic cell specific Lyn substrate 1	1.05	2.06	8.7E-06	4.0E-03
ENSMUSG00000034652	Cd300a	CD300A antigen	1.04	2.06	2.7E-06	2.5E-03
ENSMUSG00000048534	Amica1	adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1	1.04	2.05	1.3E-03	7.6E-02
ENSMUSG00000035385	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	1.04	2.05	1.3E-03	7.5E-02
ENSMUSG00000022148	Fyb	FYN binding protein	1.03	2.05	4.2E-04	4.0E-02
ENSMUSG00000059089	Fcgr4	Fc receptor, IgG, low affinity IV	1.03	2.04	1.7E-03	8.6E-02
ENSMUSG00000027797	Dclk1	doublecortin-like kinase 1	1.03	2.04	1.2E-03	7.4E-02
ENSMUSG00000055805	Fmn1	formin-like 1	1.03	2.04	1.6E-05	4.7E-03
ENSMUSG00000030220	Arhgdib	Rho, GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	1.03	2.04	3.3E-04	3.3E-02
ENSMUSG00000026786	Apbb1ip	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B	1.02	2.03	1.3E-04	1.8E-02
ENSMUSG00000018654	Ikzf1	IKAROS family zinc finger 1	1.01	2.01	8.5E-04	5.9E-02
ENSMUSG00000079363	Gbp4	guanylate binding protein 4	1.01	2.01	1.0E-04	1.6E-02
ENSMUSG00000020399	Havcr2	hepatitis A virus cellular receptor 2	1.01	2.01	1.1E-04	1.7E-02
ENSMUSG00000028459	Cd72	CD72 antigen	1.00	2.00	1.5E-03	8.0E-02
ENSMUSG00000031165	Was	Wiskott-Aldrich syndrome homolog (human)	1.00	2.00	1.9E-03	9.2E-02
ENSMUSG00000049037	Clec4a1	C-type lectin domain family 4, member a1	1.00	2.00	5.1E-04	4.4E-02
ENSMUSG00000033880	Lgals3bp	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	1.00	2.00	2.0E-04	2.5E-02
ENSMUSG00000026480	Ncf2	neutrophil cytosolic factor 2	1.00	2.00	4.2E-05	8.3E-03
ENSMUSG00000045136	Tubb2b	tubulin, beta 2B class IIB	1.00	1.99	3.0E-04	3.2E-02
ENSMUSG00000040552	C3ar1	complement component 3a receptor 1	0.99	1.98	5.4E-04	4.6E-02
ENSMUSG00000064215	Ifi27	interferon, alpha-inducible protein 27	0.99	1.98	7.3E-05	1.2E-02
ENSMUSG00000047180	Neur13	neuralized homolog 3 homolog (Drosophila)	0.98	1.98	3.5E-05	7.6E-03
ENSMUSG00000069516	Lyz2	lysozyme 2	0.98	1.97	1.3E-04	1.8E-02
ENSMUSG00000001131	Timp1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	0.97	1.96	1.8E-03	9.0E-02
ENSMUSG00000046080	Clec9a	C-type lectin domain family 9, member a	0.97	1.96	1.7E-03	8.6E-02
ENSMUSG00000004709	Cd244	CD244 natural killer cell receptor 2B4	0.97	1.96	8.3E-04	5.9E-02
ENSMUSG00000031389	Arhgap4	Rho GTPase activating protein 4	0.96	1.95	6.3E-04	4.9E-02
ENSMUSG00000004730	Adgre1	adhesion G protein-coupled receptor E1	0.96	1.95	2.8E-06	2.5E-03
ENSMUSG00000073418	C4b	complement component 4B (Chido blood group)	0.96	1.95	2.7E-04	3.0E-02

ENSMUSG00000030589	Rasgrp4	RAS guanyl releasing protein 4	0.96	1.95	8.7E-04	6.0E-02
ENSMUSG00000034641	Cd300ld	CD300 molecule-like family member d	0.96	1.94	1.3E-03	7.5E-02
ENSMUSG00000062593	Lilrb4	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4	0.95	1.94	6.3E-06	3.5E-03
ENSMUSG00000064193	Gm4735	predicted gene 4735	0.95	1.94	1.1E-03	7.1E-02
ENSMUSG00000018774	Cd68	CD68 antigen	0.95	1.94	5.4E-04	4.6E-02
ENSMUSG00000030263	Lrmp	lymphoid-restricted membrane protein	0.95	1.93	5.0E-04	4.4E-02
ENSMUSG000000027199	Gatm	glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	0.94	1.93	9.3E-05	1.5E-02
ENSMUSG00000021624	Cd180	CD180 antigen	0.94	1.92	5.1E-04	4.4E-02
ENSMUSG00000090272	Mndal	myeloid nuclear differentiation antigen like	0.93	1.91	6.9E-04	5.2E-02
ENSMUSG00000028581	Laptm5	lysosomal-associated protein transmembrane 5	0.93	1.90	2.1E-05	5.5E-03
ENSMUSG00000045382	Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	0.92	1.89	1.1E-03	6.9E-02
ENSMUSG00000002668	Dennd1c	DENN/MADD domain containing 1C	0.92	1.89	1.1E-03	7.1E-02
ENSMUSG00000035697	Hmha1	histocompatibility (minor) HA-1	0.91	1.88	2.1E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000022488	Nckap1l	NCK associated protein 1 like	0.91	1.88	2.2E-05	5.5E-03
ENSMUSG00000009292	Trpm2	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2	0.91	1.88	1.6E-03	8.4E-02
ENSMUSG00000030865	Chp2	calcineurin-like EF hand protein 2	0.91	1.88	1.8E-03	8.7E-02
ENSMUSG00000026288	Inpp5d	inositol polyphosphate-5-phosphatase D	0.91	1.87	1.1E-04	1.7E-02
ENSMUSG00000058818	Pirb	similar to Leukocyte immunoglobulin-like receptor,	0.90	1.87	6.2E-04	4.9E-02
ENSMUSG00000024013	Fgd2	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 2	0.90	1.87	4.6E-06	3.2E-03
ENSMUSG00000047867	Gimap6	GTPase, IMAP family member 6	0.90	1.86	1.9E-04	2.5E-02
ENSMUSG00000018008	Cyth4	cytohesin 4	0.90	1.86	4.9E-06	3.2E-03
ENSMUSG00000052160	Plid4	phospholipase D family, member 4	0.89	1.86	6.6E-05	1.1E-02
ENSMUSG00000036905	C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	0.89	1.86	1.2E-04	1.8E-02
ENSMUSG00000026177	Slc11a1	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters	0.89	1.85	1.4E-04	1.9E-02
ENSMUSG00000032089	Il10ra	interleukin 10 receptor, alpha	0.89	1.85	1.1E-04	1.7E-02
ENSMUSG00000024030	Abcg1	ATP-binding cassette, sub-family G	0.88	1.85	2.2E-03	1.0E-01
ENSMUSG00000075010	AW112010	expressed sequence AW112010	0.88	1.85	7.1E-04	5.3E-02
ENSMUSG00000030789	Itgax	integrin alpha X	0.88	1.84	2.0E-04	2.5E-02
ENSMUSG00000058715	Fcer1g	Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide	0.88	1.84	5.6E-06	3.4E-03
ENSMUSG00000028680	Plk3	polo-like kinase 3	0.88	1.84	7.6E-04	5.6E-02
ENSMUSG00000044811	AF251705	cDNA sequence AF251705	0.87	1.83	9.8E-04	6.5E-02
ENSMUSG00000045322	Tlr9	toll-like receptor 9	0.87	1.83	3.4E-04	3.4E-02

ENSMUSG00000049625	Tifab	TRAF-interacting protein with forkhead-associated domain, family member B	0.87	1.83	3.0E-04	3.2E-02
ENSMUSG00000058099	Nfam1	Nfat activating molecule with ITAM motif 1	0.87	1.82	1.1E-03	7.1E-02
ENSMUSG00000039158	Akna	AT-hook transcription factor	0.87	1.82	5.6E-04	4.6E-02
ENSMUSG00000043004	Gng2	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2	0.86	1.82	4.4E-05	8.4E-03
ENSMUSG00000043008	Klhl6	kelch-like 6	0.85	1.80	9.7E-04	6.4E-02
ENSMUSG00000036896	C1qc	complement component 1, q subcomponent, C chain	0.85	1.80	1.5E-03	8.0E-02
ENSMUSG00000040345	Arhgap9	Rho GTPase activating protein 9	0.85	1.80	1.4E-03	7.9E-02
ENSMUSG00000030047	Arhgap25	Rho GTPase activating protein 25	0.85	1.80	1.5E-03	8.2E-02
ENSMUSG00000074874	Ctla2b	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta	0.84	1.79	5.6E-04	4.6E-02
ENSMUSG00000060063	Alox5ap	arachidonate 5-lipoxygenase activating protein	0.84	1.79	1.4E-03	7.9E-02
ENSMUSG00000059498	Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III	0.84	1.78	1.7E-05	4.9E-03
ENSMUSG00000038608	Dock10	dedicator of cytokinesis 10	0.83	1.78	8.8E-04	6.1E-02
ENSMUSG00000000317	Bcl6b	B cell CLL/lymphoma 6, member B	0.83	1.77	1.2E-03	7.4E-02
ENSMUSG00000069892	9930111J21Rik	RIKEN cDNA 9930111J21 gene 2	0.82	1.77	1.7E-03	8.6E-02
ENSMUSG00000054203	Ifi205	interferon activated gene 205	0.82	1.77	1.7E-03	8.7E-02
ENSMUSG00000068227	Il2rb	interleukin 2 receptor, beta chain	0.82	1.77	4.2E-04	4.0E-02
ENSMUSG00000040751	Lat2	linker for activation of T cells family, member 2	0.82	1.76	1.1E-03	7.1E-02
ENSMUSG00000046805	Mpeg1	macrophage expressed gene 1	0.82	1.76	5.9E-05	1.1E-02
ENSMUSG00000022901	Cd86	CD86 antigen	0.81	1.76	6.5E-04	5.0E-02
ENSMUSG00000002325	Irf9	interferon regulatory factor 9	0.81	1.75	8.3E-04	5.9E-02
ENSMUSG00000030786	Itgam	integrin alpha M	0.80	1.74	8.5E-04	5.9E-02
ENSMUSG00000009687	Fxyd5	FXYD domain-containing ion transport regulator 5	0.80	1.74	6.9E-05	1.2E-02
ENSMUSG00000030579	Tyrobp	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	0.79	1.73	4.2E-05	8.3E-03
ENSMUSG00000034612	Chst11	carbohydrate sulfotransferase 11	0.79	1.73	6.9E-07	1.7E-03
ENSMUSG00000018819	Lsp1	lymphocyte specific 1	0.79	1.72	6.2E-04	4.9E-02
ENSMUSG00000052336	Cx3cr1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	0.78	1.72	5.1E-04	4.4E-02
ENSMUSG00000038623	Tm6sf1	transmembrane 6 superfamily member 1	0.78	1.72	5.1E-04	4.4E-02
ENSMUSG00000029771	Irf5	interferon regulatory factor 5	0.78	1.72	1.5E-03	8.0E-02
ENSMUSG00000036887	C1qa	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	0.78	1.71	2.1E-03	9.7E-02
ENSMUSG00000034786	Gpsm3	G-protein signalling modulator 3 (AGS3-like, C. elegans)	0.78	1.71	1.4E-03	7.7E-02
ENSMUSG00000025492	Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3	0.77	1.71	1.9E-03	9.1E-02
ENSMUSG00000026043	Col3a1	collagen, type III, alpha 1	0.77	1.70	7.4E-04	5.5E-02

ENSMUSG00000027219	Slc28a2	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2	0.76	1.70	2.0E-03	9.5E-02
ENSMUSG00000011256	Adam19	a disintegrin and metallopeptidase domain 19 (meltrin beta)	0.76	1.69	3.6E-05	7.7E-03
ENSMUSG00000020143	Dock2	dedicator of cyto-kinesis 2	0.74	1.67	1.5E-03	8.1E-02
ENSMUSG000000052384	Nrros	negative regulator of reactive oxygen species	0.74	1.67	4.3E-05	8.4E-03
ENSMUSG000000022489	Pde1b	phosphodiesterase 1B, Ca2+-calmodulin dependent	0.72	1.65	4.5E-04	4.2E-02
ENSMUSG000000033066	Gas7	growth arrest specific 7	0.72	1.64	1.4E-03	7.9E-02
ENSMUSG000000005413	Hmox1	heme oxygenase 1	0.72	1.64	1.5E-03	8.1E-02
ENSMUSG000000021281	Tnfaip2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	0.71	1.63	7.5E-06	3.8E-03
ENSMUSG000000038264	Sema7a	sema domain, immunoglobulin domain (Ig),	0.70	1.62	4.1E-04	4.0E-02
ENSMUSG000000045092	S1pr1	sphingosine-1-phosphate receptor 1	0.69	1.62	2.0E-04	2.5E-02
ENSMUSG000000055116	Arntl	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like	0.69	1.61	5.9E-04	4.8E-02
ENSMUSG000000026712	Mrc1	mannose receptor, C type 1	0.68	1.60	1.3E-03	7.7E-02
ENSMUSG000000024014	Pim1	proviral integration site 1	0.67	1.59	1.0E-04	1.6E-02
ENSMUSG000000026737	Pip4k2a	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, alpha	0.67	1.59	4.1E-04	4.0E-02
ENSMUSG000000030748	Il4ra	interleukin 4 receptor, alpha	0.67	1.59	7.6E-04	5.6E-02
ENSMUSG000000022797	Tfrc	transferrin receptor	0.67	1.59	2.8E-04	3.1E-02
ENSMUSG000000024621	Csf1r	colony stimulating factor 1 receptor	0.66	1.58	3.2E-04	3.3E-02
ENSMUSG000000022103	Gfra2	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2	0.66	1.58	1.2E-03	7.1E-02
ENSMUSG000000079547	H2-DMb1	histocompatibility 2, class II, locus Mb1	0.65	1.57	3.5E-05	7.6E-03
ENSMUSG000000039936	Pik3cd	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide	0.65	1.57	1.0E-03	6.7E-02
ENSMUSG000000035929	H2-Q4	histocompatibility 2, Q region locus 4	0.65	1.57	1.6E-03	8.2E-02
ENSMUSG000000090958	Lrrc32	leucine rich repeat containing 32	0.65	1.57	6.1E-05	1.1E-02
ENSMUSG000000026042	Col5a2	collagen, type V, alpha 2	0.65	1.57	2.8E-04	3.1E-02
ENSMUSG000000044350	Lacc1	laccase (multicopper oxidoreductase) domain containing 1	0.65	1.57	2.0E-04	2.5E-02
ENSMUSG000000023067	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	0.65	1.56	1.2E-05	4.2E-03
ENSMUSG000000070427	Il18bp	interleukin 18 binding protein	0.64	1.56	1.9E-04	2.5E-02
ENSMUSG000000020108	Ddit4	DNA-damage-inducible transcript 4	0.64	1.56	1.3E-03	7.6E-02
ENSMUSG000000032038	St3gal4	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4	0.64	1.55	8.5E-04	5.9E-02
ENSMUSG000000041836	Ptpre	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	0.63	1.55	5.6E-04	4.6E-02
ENSMUSG000000038543	BC028528	cDNA sequence BC028528	0.63	1.55	1.8E-03	8.8E-02
ENSMUSG000000024672	Ms4a7	membrane-spanning 4-domains	0.62	1.54	2.2E-03	1.0E-01
ENSMUSG000000030103	Bhlhe40	basic helix-loop-helix family, member e40	0.61	1.53	1.2E-03	7.4E-02

ENSMUSG00000050914	Ankrd37	ankyrin repeat domain 37	0.61	1.53	1.1E-03	6.9E-02
ENSMUSG00000015340	Cybb	cytochrome b-245, beta polypeptide	0.61	1.52	8.2E-04	5.9E-02
ENSMUSG00000027533	Fabp5	fatty acid binding protein 5, epidermal	0.58	1.50	1.2E-03	7.4E-02
ENSMUSG00000020101	4632428N05Rik	RIKEN cDNA 4632428N05 gene	0.57	1.49	1.3E-03	7.6E-02
ENSMUSG00000032035	Ets1	E26 avian leukemia oncogene 1, 5' domain	0.57	1.49	2.2E-03	1.0E-01
ENSMUSG00000026548	Slamf9	SLAM family member 9	0.55	1.46	1.2E-03	7.2E-02
ENSMUSG00000098557	Kctd12	potassium channel tetramerisation domain containing 12	0.55	1.46	4.1E-04	4.0E-02
ENSMUSG00000031207	Msn	moesin	0.54	1.46	1.0E-03	6.6E-02
ENSMUSG00000023913	Pla2g7	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase,	0.53	1.44	3.2E-04	3.3E-02
ENSMUSG00000039899	Fgl2	fibrinogen-like protein 2	0.53	1.44	7.1E-04	5.3E-02
ENSMUSG00000037649	H2-DMa	histocompatibility 2, class II, locus DMa	0.52	1.44	1.8E-03	9.0E-02
ENSMUSG00000028480	Glpr2	GLI pathogenesis-related 2	0.52	1.43	4.9E-04	4.4E-02
ENSMUSG00000068744	Psrc1	proline/serine-rich coiled-coil 1	0.52	1.43	1.8E-03	9.0E-02
ENSMUSG00000016526	Dyrk3	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3	0.51	1.43	1.8E-03	8.8E-02
ENSMUSG00000021190	Lgmn	legumain	0.50	1.42	1.1E-03	7.1E-02
ENSMUSG00000029413	Naaa	N-acylethanolamine acid amidase	0.50	1.41	8.9E-04	6.1E-02
ENSMUSG00000019843	Fyn	Fyn proto-oncogene	0.48	1.40	1.5E-03	8.1E-02
ENSMUSG00000040613	Apobec1	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1	0.47	1.39	1.8E-03	8.9E-02
ENSMUSG00000024885	Aldh3b1	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1	0.44	1.36	2.1E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000040128	Pnrc1	proline-rich nuclear receptor coactivator 1	0.43	1.34	5.6E-04	4.6E-02
ENSMUSG00000059810	Rgs3	regulator of G-protein signaling 3	0.42	1.34	3.0E-04	3.2E-02
ENSMUSG00000028599	Tnfrsf1b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	0.39	1.31	1.5E-03	8.0E-02
ENSMUSG00000016256	Ctsz	cathepsin Z	0.36	1.28	7.9E-04	5.8E-02
ENSMUSG00000027995	Tlr2	toll-like receptor 2	0.34	1.27	1.4E-03	7.8E-02
ENSMUSG00000021939	Ctsb	cathepsin B	0.30	1.23	1.4E-03	7.8E-02
ENSMUSG00000006611	Hfe	hemochromatosis	0.25	1.19	5.9E-04	4.8E-02
ENSMUSG00000096188	Cmtm4	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 4	-0.18	0.88	6.9E-04	5.2E-02
ENSMUSG00000049672	Zbtb14	zinc finger and BTB domain containing 14	-0.19	0.88	1.7E-03	8.7E-02
ENSMUSG00000037316	Bag4	BCL2-associated athanogene 4	-0.21	0.87	2.0E-03	9.5E-02
ENSMUSG00000037111	Setd7	SET domain containing (lysine methyltransferase) 7	-0.22	0.86	1.2E-03	7.4E-02
ENSMUSG00000020091	Eif4ebp2	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	-0.23	0.85	2.0E-03	9.4E-02
ENSMUSG00000085882	2610507I01Rik	RIKEN cDNA 2610507I01 gene	-0.24	0.84	1.2E-03	7.4E-02

ENSMUSG00000050064	Zfp697	zinc finger protein 697	-0.25	0.84	1.2E-03	7.1E-02
ENSMUSG00000037885	Stk35	serine/threonine kinase 35	-0.25	0.84	1.8E-03	8.8E-02
ENSMUSG00000021327	Zkscan3	zinc finger with KRAB and SCAN domains 3	-0.26	0.84	1.7E-03	8.6E-02
ENSMUSG00000030518	Fam189a1	family with sequence similarity 189	-0.28	0.83	1.5E-03	7.9E-02
ENSMUSG00000048371	Pdp2	pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 2	-0.29	0.82	1.5E-03	8.0E-02
ENSMUSG00000038267	Slc22a23	solute carrier family 22, member 23	-0.32	0.80	3.2E-04	3.3E-02
ENSMUSG00000024900	Cpt1a	carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	-0.36	0.78	2.2E-03	1.0E-01
ENSMUSG00000028957	Per3	period circadian clock 3	-0.39	0.76	3.7E-04	3.7E-02
ENSMUSG00000044847	Lsm11	U7 snRNP-specific Sm-like protein LSM11	-0.41	0.76	1.8E-03	8.8E-02
ENSMUSG00000057396	Zfp759	zinc finger protein 759	-0.43	0.74	1.1E-03	6.9E-02
ENSMUSG00000028150	Rorc	RAR-related orphan receptor gamma	-0.45	0.73	2.3E-05	5.7E-03
ENSMUSG00000049265	Kcnk3	potassium channel, subfamily K, member 3	-0.68	0.62	2.1E-04	2.5E-02
ENSMUSG00000022508	Bcl6	B cell leukemia/lymphoma 6	-0.86	0.55	1.7E-03	8.7E-02
ENSMUSG00000078252	Krtap17-1	keratin associated protein 17-1	-1.00	0.50	4.4E-05	8.4E-03
ENSMUSG00000053214	Gm9899	predicted gene 9899	-1.02	0.49	1.1E-07	8.7E-04

FC: Fold Change; **Log₂FC:** Log na base 2 do fold change.

ANEXO 2 – Lista de genes diferencialmente expressos em animais tratados por doze semanas com dieta baseada em banha de porco quando comparado aos animais tratados com dieta baseada em óleo de linhaça. P-adj: 0,10.

Ensembl Gene ID	Gene Symbol	Gene Name	Log2FC	FC	p-value	p-adj
ENSMUSG00000009185	Ccl8	chemokine (C-C motif) ligand 8	1.74	3.34	1.3E-03	1.0E-01
ENSMUSG000000095771	Igkv14-111	immunoglobulin kappa variable 14-111	1.67	3.18	1.8E-04	3.9E-02
ENSMUSG000000040950	Mgl2	macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 2	1.21	2.32	4.3E-05	1.9E-02
ENSMUSG000000071714	Csf2rb2	colony stimulating factor 2 receptor, beta 2, low-affinity	1.19	2.28	2.4E-04	4.5E-02
ENSMUSG000000019122	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9	1.08	2.12	6.6E-04	7.5E-02
ENSMUSG000000047631	Apof	apolipoprotein F	0.91	1.88	4.3E-04	5.6E-02
ENSMUSG000000071713	Csf2rb	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity	0.90	1.87	1.2E-03	1.0E-01
ENSMUSG000000020077	Srgn	serglycin	0.88	1.85	9.3E-04	9.0E-02
ENSMUSG000000055116	Arntl	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like	0.88	1.84	1.2E-05	8.5E-03
ENSMUSG000000026043	Col3a1	collagen, type III, alpha 1	0.81	1.75	3.8E-04	5.4E-02
ENSMUSG000000021423	Ly86	lymphocyte antigen 86	0.76	1.70	1.2E-03	1.0E-01
ENSMUSG000000016526	Dyrk3	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3	0.68	1.60	3.5E-05	1.7E-02
ENSMUSG000000042918	Mamstr	MEF2 activating motif and SAP domain containing transcriptional regulator	0.66	1.58	3.1E-05	1.6E-02
ENSMUSG000000058715	Fcer1g	Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide	0.64	1.56	8.9E-04	9.0E-02
ENSMUSG000000022797	Tfrc	transferrin receptor	0.63	1.55	5.6E-04	6.7E-02
ENSMUSG000000050914	Ankrd37	ankyrin repeat domain 37	0.63	1.55	7.8E-04	8.1E-02
ENSMUSG000000023067	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	0.62	1.54	2.1E-05	1.2E-02
ENSMUSG000000021281	Tnfaip2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	0.60	1.51	1.3E-04	3.1E-02
ENSMUSG000000052384	Nrros	negative regulator of reactive oxygen species	0.58	1.50	1.2E-03	9.9E-02
ENSMUSG000000047669	Msl3l2	male-specific lethal 3-like 2 (Drosophila)	0.57	1.48	5.4E-05	1.9E-02
ENSMUSG000000047139	Cd24a	CD24a antigen	0.56	1.48	8.2E-04	8.3E-02
ENSMUSG000000068744	Psrc1	proline/serine-rich coiled-coil 1	0.54	1.45	1.0E-03	9.4E-02
ENSMUSG000000028583	Pdpn	podoplanin	0.54	1.45	6.8E-04	7.6E-02
ENSMUSG000000079355	Ackr4	atypical chemokine receptor 4	0.52	1.43	1.1E-03	9.8E-02
ENSMUSG000000096210	H1f0	H1 histone family, member 0	0.48	1.40	3.6E-06	4.3E-03
ENSMUSG000000024640	Psat1	phosphoserine aminotransferase 1	0.46	1.38	7.3E-04	7.8E-02
ENSMUSG000000019960	Dusp6	dual specificity phosphatase 6	0.44	1.36	1.7E-04	3.8E-02

ENSMUSG00000025395	Prim1	DNA primase, p49 subunit	0.44	1.36	9.2E-04	9.0E-02
ENSMUSG00000069835	Sat2	spermidine/spermine N1-acetyl transferase 2	0.42	1.34	1.6E-04	3.6E-02
ENSMUSG00000040128	Pnrc1	proline-rich nuclear receptor coactivator 1	0.42	1.34	6.1E-04	7.1E-02
ENSMUSG00000059810	Rgs3	regulator of G-protein signaling 3	0.42	1.34	3.4E-04	5.2E-02
ENSMUSG00000030200	Bcl2l14	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator)	0.42	1.34	9.8E-04	9.2E-02
ENSMUSG00000063524	Eno1	enolase 1, alpha non-neuron	0.41	1.33	1.4E-03	1.1E-01
ENSMUSG00000046079	Lrrc8d	leucine rich repeat containing 8D	0.38	1.31	9.2E-05	2.5E-02
ENSMUSG00000022500	Litaf	LPS-induced TN factor	0.36	1.28	7.1E-04	7.8E-02
ENSMUSG00000064360	mt-Nd3	mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 3	0.36	1.28	1.0E-03	9.2E-02
ENSMUSG00000016256	Ctsz	cathepsin Z	0.34	1.27	1.4E-03	1.1E-01
ENSMUSG00000001525	Tubb5	tubulin, beta 5 class I	0.34	1.26	9.3E-04	9.0E-02
ENSMUSG000000021939	Ctsb	cathepsin B	0.33	1.26	4.5E-04	5.7E-02
ENSMUSG00000041845	Rhod	ras homolog gene family, member D	0.31	1.24	1.1E-03	9.8E-02
ENSMUSG00000015944	Gatsl2	GATS protein-like 2	0.26	1.20	8.1E-04	8.3E-02
ENSMUSG00000049550	Clip1	CAP-GLY domain containing linker protein 1	-0.18	0.89	5.6E-05	2.0E-02
ENSMUSG000000071659	Hnrnpul2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 2	-0.18	0.88	5.3E-05	1.9E-02
ENSMUSG00000041415	Dicer1	dicer 1, ribonuclease type III	-0.19	0.88	2.5E-04	4.5E-02
ENSMUSG000000031858	Mau2	MAU2 chromatid cohesion factor homolog (C. elegans)	-0.19	0.87	1.0E-03	9.2E-02
ENSMUSG000000024045	Akap8	A kinase (PRKA) anchor protein 8	-0.20	0.87	3.4E-04	5.2E-02
ENSMUSG000000055024	Ep300	E1A binding protein p300	-0.20	0.87	6.8E-04	7.6E-02
ENSMUSG000000096188	Cmtm4	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 4	-0.20	0.87	2.1E-04	4.0E-02
ENSMUSG000000034525	Ice1	interactor of little elongation complex ELL subunit 1	-0.20	0.87	1.1E-03	9.6E-02
ENSMUSG000000038648	Creb3l2	cAMP responsive element binding protein 3-like 2	-0.20	0.87	7.8E-04	8.1E-02
ENSMUSG000000069089	Cdk7	cyclin-dependent kinase 7	-0.21	0.87	2.1E-05	1.2E-02
ENSMUSG000000049672	Zbtb14	zinc finger and BTB domain containing 14	-0.21	0.86	4.2E-04	5.6E-02
ENSMUSG000000038170	Pde4dip	phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)	-0.22	0.86	7.3E-04	7.8E-02
ENSMUSG000000015488	Cacfd1	calcium channel flower domain containing 1	-0.22	0.86	3.5E-04	5.2E-02
ENSMUSG000000021681	Aggf1	angiogenic factor with G patch and FHA domains 1	-0.22	0.86	3.8E-04	5.4E-02
ENSMUSG000000032097	Ddx6	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6	-0.22	0.86	3.1E-04	5.2E-02
ENSMUSG000000033430	Terf2ip	telomeric repeat binding factor 2, interacting protein	-0.22	0.86	5.0E-04	6.1E-02
ENSMUSG000000022228	Zscan26	zinc finger and SCAN domain containing 26	-0.22	0.86	1.0E-03	9.2E-02

ENSMUSG00000026788	Zbtb43	zinc finger and BTB domain containing 43	-0.23	0.86	1.2E-03	9.8E-02
ENSMUSG00000078584	AU022252	expressed sequence AU022252	-0.23	0.85	8.0E-04	8.3E-02
ENSMUSG00000058997	Vwa8	von Willebrand factor A domain containing 8	-0.23	0.85	9.7E-05	2.6E-02
ENSMUSG00000029131	Dnajb6	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	-0.23	0.85	2.7E-05	1.4E-02
ENSMUSG00000039473	Ubn1	ubiquitin 1	-0.23	0.85	3.2E-04	5.2E-02
ENSMUSG00000038582	Pptc7	PTC7 protein phosphatase homolog (S. cerevisiae)	-0.23	0.85	2.8E-04	4.8E-02
ENSMUSG00000039523	Cep104	centrosomal protein 104	-0.24	0.85	4.1E-04	5.6E-02
ENSMUSG00000037355	Uvssa	UV stimulated scaffold protein A	-0.24	0.85	9.8E-04	9.2E-02
ENSMUSG00000018736	Ndel1	nuclear distribution gene E-like homolog 1 (A. nidulans)	-0.24	0.85	9.9E-05	2.6E-02
ENSMUSG00000037316	Bag4	BCL2-associated athanogene 4	-0.24	0.84	2.4E-04	4.5E-02
ENSMUSG00000024083	Pja2	praja 2, RING-H2 motif containing	-0.25	0.84	4.8E-04	5.9E-02
ENSMUSG00000040481	Bptf	bromodomain PHD finger transcription factor	-0.25	0.84	3.5E-04	5.2E-02
ENSMUSG00000026790	Odf2	outer dense fiber of sperm tails 2	-0.25	0.84	4.6E-05	1.9E-02
ENSMUSG00000020482	Ccdc117	coiled-coil domain containing 117	-0.26	0.84	1.1E-03	9.8E-02
ENSMUSG00000042650	Alkbh5	alkB, alkylation repair homolog 5 (E. coli)	-0.26	0.83	1.9E-06	2.8E-03
ENSMUSG00000014763	Fam120b	family with sequence similarity 120, member B	-0.26	0.83	7.3E-06	6.1E-03
ENSMUSG00000085882	2610507I01Rik	RIKEN cDNA 2610507I01 gene	-0.26	0.83	4.7E-04	5.9E-02
ENSMUSG00000029502	Golga3	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 3	-0.27	0.83	2.7E-04	4.7E-02
ENSMUSG00000020700	Map3k3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	-0.27	0.83	3.6E-04	5.3E-02
ENSMUSG00000028890	Mtf1	metal response element binding transcription factor 1	-0.27	0.83	2.6E-04	4.6E-02
ENSMUSG00000072568	Fam84b	family with sequence similarity 84, member B	-0.27	0.83	4.3E-04	5.7E-02
ENSMUSG00000058706	0610030E20Rik	RIKEN cDNA 0610030E20 gene	-0.28	0.83	9.4E-06	7.3E-03
ENSMUSG00000031016	Wee1	WEE 1 homolog 1	-0.28	0.82	1.2E-03	9.8E-02
ENSMUSG00000030779	Rbbp6	retinoblastoma binding protein 6	-0.28	0.82	1.1E-03	9.8E-02
ENSMUSG00000031393	Mecp2	methyl CpG binding protein 2	-0.28	0.82	1.1E-03	9.8E-02
ENSMUSG00000057101	Zfp180	zinc finger protein 180	-0.28	0.82	5.2E-05	1.9E-02
ENSMUSG00000022412	Mief1	mitochondrial elongation factor 1	-0.28	0.82	1.9E-04	3.9E-02
ENSMUSG00000035064	Eef2k	eukaryotic elongation factor-2 kinase	-0.28	0.82	6.6E-04	7.5E-02
ENSMUSG00000014498	Ankrd52	ankyrin repeat domain 52	-0.28	0.82	1.1E-03	9.5E-02
ENSMUSG00000032840	2410131K14Rik	RIKEN cDNA 2410131K14 gene	-0.28	0.82	5.2E-04	6.4E-02
ENSMUSG00000040325	Vprbp	Vpr (HIV-1) binding protein	-0.29	0.82	3.4E-04	5.2E-02

ENSMUSG00000024622	Hmgxb3	HMG box domain containing 3	-0.29	0.82	4.3E-04	5.6E-02
ENSMUSG00000002845	Tmem39a	transmembrane protein 39a	-0.30	0.82	2.5E-04	4.5E-02
ENSMUSG000000028709	Mob3c	MOB kinase activator 3C	-0.30	0.81	9.0E-04	9.0E-02
ENSMUSG000000057440	Mpp7	membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7)	-0.30	0.81	7.4E-04	7.9E-02
ENSMUSG000000002748	Baz1b	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B	-0.30	0.81	6.0E-08	2.4E-04
ENSMUSG000000050890	Pdik1l	PDLIM1 interacting kinase 1 like	-0.30	0.81	3.5E-04	5.2E-02
ENSMUSG000000074194	Zfp791	zinc finger protein 791	-0.30	0.81	1.2E-04	3.1E-02
ENSMUSG000000026283	Ing5	inhibitor of growth family, member 5	-0.31	0.81	4.2E-05	1.9E-02
ENSMUSG000000020137	Thap2	THAP domain containing, apoptosis associated protein 2	-0.31	0.81	1.4E-04	3.3E-02
ENSMUSG000000038485	Socs7	suppressor of cytokine signaling 7	-0.31	0.81	4.4E-05	1.9E-02
ENSMUSG000000026031	Cflar	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	-0.31	0.80	2.8E-06	3.7E-03
ENSMUSG000000020074	Ccar1	cell division cycle and apoptosis regulator 1	-0.31	0.80	2.0E-04	4.0E-02
ENSMUSG000000032932	Hspa13	heat shock protein 70 family, member 13	-0.32	0.80	1.8E-04	3.9E-02
ENSMUSG000000040599	Mis12	MIS12 homolog (yeast)	-0.32	0.80	2.4E-04	4.5E-02
ENSMUSG000000020091	Eif4ebp2	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	-0.32	0.80	1.9E-05	1.2E-02
ENSMUSG000000021327	Zkscan3	zinc finger with KRAB and SCAN domains 3	-0.32	0.80	7.5E-05	2.4E-02
ENSMUSG000000021392	Nol8	nucleolar protein 8	-0.32	0.80	7.9E-05	2.4E-02
ENSMUSG000000026135	Zfp142	zinc finger protein 142	-0.33	0.80	2.0E-05	1.2E-02
ENSMUSG000000034243	Golgb1	golgi autoantigen, golgin subfamily b, macrogolgin 1	-0.33	0.80	6.4E-07	1.3E-03
ENSMUSG000000044447	Dock5	dedicator of cytokinesis 5	-0.33	0.79	9.8E-04	9.2E-02
ENSMUSG000000048109	Rbm15	RNA binding motif protein 15	-0.34	0.79	3.6E-04	5.3E-02
ENSMUSG000000071793	2610005L07Rik	RIKEN cDNA 2610005L07 gene	-0.34	0.79	4.7E-04	5.9E-02
ENSMUSG000000015501	Hivep2	human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 2	-0.35	0.79	9.9E-06	7.3E-03
ENSMUSG000000022389	Tef	thyrotroph embryonic factor	-0.35	0.79	9.1E-04	9.0E-02
ENSMUSG000000038267	Slc22a23	solute carrier family 22, member 23	-0.35	0.79	8.6E-05	2.5E-02
ENSMUSG000000039740	Alg2	asparagine-linked glycosylation 2 (alpha-1,3-mannosyltransferase)	-0.35	0.78	7.7E-05	2.4E-02
ENSMUSG000000032788	Pdxk	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase	-0.36	0.78	6.8E-05	2.3E-02
ENSMUSG000000041096	Tspyl2	TSPY-like 2	-0.37	0.77	9.4E-04	9.0E-02
ENSMUSG000000050064	Zfp697	zinc finger protein 697	-0.38	0.77	4.0E-07	1.2E-03
ENSMUSG000000037885	Stk35	serine/threonine kinase 35	-0.38	0.77	1.2E-06	2.0E-03
ENSMUSG000000032041	Tirap	toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein	-0.38	0.77	3.7E-04	5.3E-02

ENSMUSG00000043998	Mgat2	mannoside acetylglucosaminyltransferase 2	-0.39	0.76	5.7E-04	6.7E-02
ENSMUSG00000051674	Dcun1d4	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 4 (S. cerevisiae)	-0.39	0.76	8.9E-05	2.5E-02
ENSMUSG00000039218	Srrm2	serine/arginine repetitive matrix 2	-0.39	0.76	5.6E-07	1.3E-03
ENSMUSG00000022772	Senp5	SUMO/sentrin specific peptidase 5	-0.40	0.76	5.3E-06	5.7E-03
ENSMUSG00000011427	Zfp790	zinc finger protein 790	-0.40	0.76	4.6E-05	1.9E-02
ENSMUSG00000070461	9230112E08 gene	RIKEN cDNA 9230112E08 gene	-0.40	0.76	4.4E-04	5.7E-02
ENSMUSG00000030055	Rab43	RAB43, member RAS oncogene family	-0.40	0.76	1.3E-04	3.1E-02
ENSMUSG00000085028	Slc2a4rg-ps	Slc2a4 regulator, pseudogene	-0.41	0.75	5.4E-04	6.4E-02
ENSMUSG00000066687	Zbtb16	zinc finger and BTB domain containing 16	-0.42	0.75	3.4E-04	5.2E-02
ENSMUSG00000028701	Lurap1	leucine rich adaptor protein 1	-0.42	0.74	1.3E-04	3.1E-02
ENSMUSG00000028957	Per3	period circadian clock 3	-0.44	0.74	7.2E-05	2.3E-02
ENSMUSG00000009145	Dqx1	DEAQ RNA-dependent ATPase	-0.44	0.74	2.0E-04	4.0E-02
ENSMUSG00000030554	Synm	synemin, intermediate filament protein	-0.44	0.74	1.2E-03	1.0E-01
ENSMUSG00000031861	Lpar2	lysophosphatidic acid receptor 2	-0.47	0.72	1.2E-03	9.8E-02
ENSMUSG00000030031	Kbtbd8	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 8	-0.48	0.71	1.6E-04	3.6E-02
ENSMUSG00000025981	Coq10b	coenzyme Q10 homolog B (S. cerevisiae)	-0.49	0.71	7.2E-04	7.8E-02
ENSMUSG00000041762	Gpr155	G protein-coupled receptor 155	-0.50	0.71	8.5E-05	2.5E-02
ENSMUSG00000039092	Sptlc3	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 3	-0.50	0.71	1.4E-03	1.1E-01
ENSMUSG00000069045	Ddx3y	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	-0.51	0.70	6.7E-04	7.6E-02
ENSMUSG00000070407	Hs3st3b1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B1	-0.51	0.70	6.2E-06	6.0E-03
ENSMUSG00000014905	Dnajb9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	-0.52	0.70	2.0E-04	4.0E-02
ENSMUSG00000028150	Rorc	RAR-related orphan receptor gamma	-0.60	0.66	2.0E-08	2.3E-04
ENSMUSG00000049265	Kcnk3	potassium channel, subfamily K, member 3	-0.60	0.66	1.0E-03	9.2E-02
ENSMUSG00000055866	Per2	period circadian clock 2	-0.74	0.60	6.9E-06	6.1E-03
ENSMUSG00000025592	Dach2	dachshund 2 (Drosophila)	-0.74	0.60	2.3E-04	4.4E-02
ENSMUSG00000022508	Bcl6	B cell leukemia/lymphoma 6	-1.00	0.50	2.9E-04	4.8E-02
ENSMUSG00000021838	Samd4	sterile alpha motif domain containing 4	-1.01	0.50	5.3E-05	1.9E-02
ENSMUSG00000053214	Gm9899	predicted gene 9899	-1.05	0.48	4.5E-08	2.4E-04
ENSMUSG00000026691	Fmo3	flavin containing monooxygenase 3	1.15	-0.45	4.0E-04	5.5E-02

FC: Fold Change; **Log₂FC:** Log na base 2 do fold change.

ANEXO 3 – Lista de genes diferencialmente expressos em animais tratados por trinta e duas semanas com dieta baseada em banha de porco quando comparado aos animais tratados com dieta baseada em óleo de soja. P-adj: 0,10.

Ensembl Gene ID	Gene Symbol	Gene Name	Log2FC	FC	p-value	p-adj
ENSMUSG00000073940	Hbb-bt	hemoglobin, beta adult t chain	2.23	4.70	3.3E-06	1.9E-03
ENSMUSG00000052305	Fitm2	fat storage-inducing transmembrane protein 2	2.17	4.51	3.1E-06	1.9E-03
ENSMUSG00000069917	Hba-a2	hemoglobin alpha, adult chain 2	1.96	3.90	4.4E-05	1.2E-02
ENSMUSG00000069919	Hba-a1	hemoglobin alpha, adult chain 1	1.75	3.36	3.3E-04	3.1E-02
ENSMUSG00000061100	Retnla	resistin like alpha	1.19	2.29	1.1E-04	1.9E-02
ENSMUSG00000037071	Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	1.18	2.27	7.2E-05	1.4E-02
ENSMUSG00000024125	Sbpl	spermine binding protein-like	1.16	2.23	1.9E-04	2.3E-02
ENSMUSG00000032291	Crabp1	cellular retinoic acid binding protein I	0.77	1.70	2.4E-04	2.5E-02
ENSMUSG00000029866	Kel	Kell blood group	0.73	1.66	9.5E-04	5.8E-02
ENSMUSG00000056973	Ces1d	carboxylesterase 1D	0.72	1.64	1.0E-03	6.0E-02
ENSMUSG00000024128	Sbp	spermine binding protein	0.68	1.60	1.9E-03	8.3E-02
ENSMUSG00000032575	Manf	mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	0.57	1.48	9.9E-07	9.1E-04
ENSMUSG00000031824	6430548M08Rik	RIKEN cDNA 6430548M08 gene	0.55	1.47	1.3E-03	6.9E-02
ENSMUSG00000026864	Hspa5	heat shock protein 5	0.53	1.45	8.4E-07	9.1E-04
ENSMUSG00000014905	Dnajb9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	0.52	1.43	1.9E-04	2.3E-02
ENSMUSG00000023272	Creld2	cysteine-rich with EGF-like domains 2	0.51	1.43	1.6E-04	2.3E-02
ENSMUSG00000072949	Acot1	acyl-CoA thioesterase 1	0.51	1.42	2.6E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000020651	Slc26a4	solute carrier family 26, member 4	0.49	1.40	3.1E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000080115	Mettl21b	methyltransferase like 21B	0.46	1.38	6.7E-05	1.4E-02
ENSMUSG00000010830	Kdelr3	KDEL (endoplasmic reticulum protein retention receptor 3	0.46	1.38	1.1E-04	1.9E-02
ENSMUSG00000023393	Slc17a9	solute carrier family 17, member 9	0.46	1.37	1.5E-05	5.3E-03
ENSMUSG00000020581	Agr2	anterior gradient 2	0.46	1.37	1.3E-09	3.8E-06
ENSMUSG00000026189	Pecr	peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	0.45	1.37	9.8E-07	9.1E-04
ENSMUSG00000031770	Herpud1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible,	0.43	1.35	3.1E-04	3.0E-02
ENSMUSG00000071506	Tmem139	transmembrane protein 139	0.43	1.35	2.8E-03	9.6E-02
ENSMUSG00000078566	Bnip3	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3	0.42	1.34	1.8E-04	2.3E-02
ENSMUSG00000034563	Ccpg1	cell cycle progression 1	0.42	1.34	3.5E-04	3.2E-02

ENSMUSG00000032557	Uba5	ubiquitin-like modifier activating enzyme 5	0.41	1.33	1.9E-05	6.3E-03
ENSMUSG00000008348	Ubc	ubiquitin C	0.41	1.33	1.7E-03	7.9E-02
ENSMUSG00000027937	Jtb	jumping translocation breakpoint	0.41	1.33	6.7E-04	4.8E-02
ENSMUSG00000070284	Gmppb	GDP-mannose pyrophosphorylase B	0.41	1.32	3.1E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000041084	Ostc	oligosaccharyltransferase complex subunit	0.40	1.32	1.2E-04	2.0E-02
ENSMUSG00000042682	Selk	selenoprotein K	0.40	1.32	4.2E-07	6.4E-04
ENSMUSG00000026568	Mpc2	mitochondrial pyruvate carrier 2	0.40	1.32	1.6E-03	7.8E-02
ENSMUSG00000021792	Fam213a	family with sequence similarity 213, member A	0.40	1.32	2.6E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000023263	9530002B09Rik	RIKEN cDNA 9530002B09 gene	0.38	1.31	2.3E-03	9.0E-02
ENSMUSG00000085156	Gm11974	predicted gene 11974	0.38	1.30	4.7E-04	4.0E-02
ENSMUSG00000039221	Rpl22l1	ribosomal protein L22 like 1	0.38	1.30	1.7E-03	7.9E-02
ENSMUSG00000032526	Deb1	differentially expressed in B16F10 1	0.38	1.30	3.5E-04	3.2E-02
ENSMUSG00000078974	Sec61g	SEC61, gamma subunit	0.37	1.30	4.5E-04	3.9E-02
ENSMUSG00000022844	Pdia5	protein disulfide isomerase associated 5	0.37	1.30	2.5E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000025967	Eef1b2	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	0.37	1.29	4.9E-05	1.3E-02
ENSMUSG00000054237	Fra10ac1	FRA10AC1 homolog (human)	0.37	1.29	1.1E-04	1.9E-02
ENSMUSG00000069633	Pex11g	peroxisomal biogenesis factor 11 gamma	0.37	1.29	1.2E-04	2.0E-02
ENSMUSG00000032115	Hyou1	hypoxia up-regulated 1	0.37	1.29	1.5E-04	2.3E-02
ENSMUSG00000026511	Srp9	signal recognition particle 9	0.36	1.28	2.0E-03	8.4E-02
ENSMUSG00000029752	Asns	asparagine synthetase	0.36	1.28	9.0E-06	3.7E-03
ENSMUSG00000002580	Mien1	migration and invasion enhancer 1	0.36	1.28	2.5E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000038871	Bpgm	2,3-bisphosphoglycerate mutase	0.35	1.27	1.1E-04	1.9E-02
ENSMUSG00000027808	Serp1	stress-associated endoplasmic reticulum protein 1	0.35	1.27	3.9E-06	2.0E-03
ENSMUSG00000026670	Uap1	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1	0.35	1.27	1.1E-07	2.0E-04
ENSMUSG00000031402	Mpp1	membrane protein, palmitoylated	0.34	1.27	2.3E-03	9.0E-02
ENSMUSG00000020629	Adi1	acireductone dioxygenase 1	0.34	1.27	1.7E-03	7.9E-02
ENSMUSG00000028261	Ndufaf4	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex, assembly factor 4	0.34	1.27	8.7E-04	5.5E-02
ENSMUSG00000032757	Bet1	blocked early in transport 1 homolog (S. cerevisiae)	0.34	1.27	1.6E-06	1.4E-03
ENSMUSG00000051579	Tceal8	transcription elongation factor A (SII)-like 8	0.34	1.27	2.2E-04	2.4E-02
ENSMUSG00000020460	Rps27a	ribosomal protein S27A	0.34	1.27	1.2E-03	6.6E-02
ENSMUSG00000024747	Aldh1a7	aldehyde dehydrogenase family 1	0.34	1.27	3.2E-03	9.9E-02

ENSMUSG00000032478	Nme6	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 6	0.34	1.26	2.6E-04	2.6E-02
ENSMUSG00000079111	Kdelr2	KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	0.34	1.26	1.7E-03	7.9E-02
ENSMUSG00000029864	Gstk1	glutathione S-transferase kappa 1	0.34	1.26	4.5E-04	3.8E-02
ENSMUSG00000035227	Spcs2	signal peptidase complex subunit 2 homolog (S. cerevisiae)	0.33	1.26	1.2E-05	4.6E-03
ENSMUSG00000063049	Ing2	inhibitor of growth family, member 2	0.33	1.26	2.4E-04	2.5E-02
ENSMUSG00000024248	Cox7a2l	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2-like	0.33	1.26	3.1E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000024487	Yipf5	Yip1 domain family, member 5	0.33	1.25	2.3E-04	2.5E-02
ENSMUSG00000039197	Adk	adenosine kinase	0.33	1.25	5.6E-05	1.3E-02
ENSMUSG00000072889	Nfxl1	nuclear transcription factor, X-box binding-like 1	0.33	1.25	2.3E-03	9.0E-02
ENSMUSG00000014504	Srp19	signal recognition particle 19	0.32	1.25	6.6E-04	4.8E-02
ENSMUSG00000053332	Gas5	growth arrest specific 5	0.32	1.25	1.1E-03	6.3E-02
ENSMUSG00000028811	Yars	tyrosyl-tRNA synthetase	0.32	1.25	2.7E-06	1.9E-03
ENSMUSG00000078453	Abrac1	ABRA C-terminal like	0.32	1.25	1.3E-03	6.7E-02
ENSMUSG00000024150	Mcf2	multiple coagulation factor deficiency 2	0.32	1.25	6.4E-10	2.9E-06
ENSMUSG00000021917	Spcs1	signal peptidase complex subunit 1 homolog (S. cerevisiae)	0.32	1.25	2.1E-04	2.4E-02
ENSMUSG00000027357	Crls1	cardiolipin synthase 1	0.32	1.25	2.4E-04	2.5E-02
ENSMUSG00000028683	Eif2b3	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 3	0.31	1.24	1.9E-03	8.3E-02
ENSMUSG00000075701	Vimp	VCP-interacting membrane protein	0.31	1.24	3.6E-04	3.2E-02
ENSMUSG00000079641	Rpl39	ribosomal protein L39	0.31	1.24	1.3E-03	6.9E-02
ENSMUSG00000019782	Rwdd1	RWD domain containing 1	0.31	1.24	3.1E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000051256	Jagn1	jagunal homolog 1 (Drosophila)	0.31	1.24	8.0E-04	5.3E-02
ENSMUSG00000027165	B230118H07Rik	RIKEN cDNA B230118H07 gene	0.31	1.24	1.4E-03	7.0E-02
ENSMUSG00000028889	Yrdc	yrnC domain containing (E.coli)	0.31	1.24	9.5E-05	1.8E-02
ENSMUSG00000028081	Rps3a1	ribosomal protein S3A1	0.31	1.24	3.4E-04	3.2E-02
ENSMUSG00000018672	Copz2	coatamer protein complex, subunit zeta 2	0.31	1.24	3.6E-04	3.2E-02
ENSMUSG00000027637	1110008F13Rik	RIKEN cDNA 1110008F13 gene	0.30	1.24	1.4E-03	7.0E-02
ENSMUSG00000028271	Gtf2b	general transcription factor IIB	0.30	1.23	3.4E-05	9.6E-03
ENSMUSG00000021094	Dhrs7	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7	0.30	1.23	5.0E-04	4.0E-02
ENSMUSG00000009927	Rps25	ribosomal protein S25	0.30	1.23	2.0E-03	8.4E-02
ENSMUSG00000027170	Eif3m	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M	0.30	1.23	2.2E-04	2.4E-02
ENSMUSG00000028669	Pithd1	PITH domain containing 1	0.30	1.23	2.7E-03	9.3E-02

ENSMUSG00000045302	Preb	prolactin regulatory element binding	0.30	1.23	1.8E-03	8.0E-02
ENSMUSG00000036781	Rps27l	ribosomal protein S27-like	0.30	1.23	9.7E-04	5.8E-02
ENSMUSG00000027879	Sec22b	SEC22 homolog B	0.30	1.23	2.6E-05	7.9E-03
ENSMUSG00000029535	Triap1	TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1	0.30	1.23	2.6E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000030876	Mettl9	methyltransferase like 9	0.30	1.23	1.7E-03	7.9E-02
ENSMUSG00000027673	Ndufb5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5	0.30	1.23	1.7E-03	7.9E-02
ENSMUSG00000054408	Spcs3	signal peptidase complex subunit 3 homolog (S. cerevisiae)	0.29	1.23	9.0E-08	2.0E-04
ENSMUSG00000041355	Ssr2	signal sequence receptor, beta	0.29	1.22	2.1E-03	8.6E-02
ENSMUSG00000038462	Uqcrcf1	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	0.29	1.22	5.9E-04	4.4E-02
ENSMUSG00000015759	Cnih1	cornichon homolog 1 (Drosophila)	0.29	1.22	6.9E-05	1.4E-02
ENSMUSG00000033429	Mcee	methylmalonyl CoA epimerase	0.29	1.22	2.3E-03	9.0E-02
ENSMUSG00000027746	Ufm1	ubiquitin-fold modifier 1	0.29	1.22	2.5E-05	7.9E-03
ENSMUSG00000021731	Mrps30	mitochondrial ribosomal protein S30	0.29	1.22	3.2E-03	1.0E-01
ENSMUSG00000062963	Ufc1	ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1	0.29	1.22	1.9E-03	8.3E-02
ENSMUSG00000051234	Rnf7	ring finger protein 7	0.29	1.22	3.0E-03	9.8E-02
ENSMUSG00000043998	Mgat2	mannoside acetylglucosaminyltransferase 2	0.29	1.22	2.5E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000026766	Mmadhc	methylmalonic aciduria cblD type, with homocystinuria	0.28	1.22	5.0E-04	4.0E-02
ENSMUSG00000029125	Stx18	syntaxin 18	0.28	1.22	1.7E-03	7.9E-02
ENSMUSG00000030630	Fah	fumarylacetoacetate hydrolase	0.28	1.22	2.5E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000047215	Rpl9	ribosomal protein L9	0.28	1.22	9.8E-05	1.8E-02
ENSMUSG00000004460	Dnajb11	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11	0.28	1.22	4.4E-04	3.8E-02
ENSMUSG00000031320	Rps4x	ribosomal protein S4, X-linked	0.28	1.21	6.3E-05	1.4E-02
ENSMUSG00000097769	Snhg4	small nucleolar RNA host gene 4	0.28	1.21	2.3E-03	9.0E-02
ENSMUSG00000062328	Rpl17	ribosomal protein L17	0.28	1.21	1.7E-03	7.9E-02
ENSMUSG00000078713	Tomm5	translocase of outer mitochondrial membrane 5 homolog (yeast)	0.28	1.21	1.9E-03	8.3E-02
ENSMUSG00000072770	Acrbp	proacrosin binding protein	0.28	1.21	3.2E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000058558	Rpl5	ribosomal protein L5	0.28	1.21	3.0E-03	9.8E-02
ENSMUSG00000031532	Saraf	store-operated calcium entry-associated regulatory factor	0.28	1.21	2.6E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000022757	Tfg	Trk-fused gene	0.27	1.21	2.1E-04	2.4E-02
ENSMUSG00000024516	Sec11c	SEC11 homolog C (S. cerevisiae)	0.27	1.21	2.0E-03	8.4E-02
ENSMUSG00000035530	Eif1	eukaryotic translation initiation factor 1	0.27	1.21	3.2E-04	3.0E-02

ENSMUSG00000044408	Sptssa	serine palmitoyltransferase, small subunit A	0.27	1.20	2.4E-03	9.2E-02
ENSMUSG00000018567	Gabarap	gamma-aminobutyric acid receptor associated protein	0.26	1.20	2.5E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000061315	Naca	nascent polypeptide-associated complex alpha polypeptide	0.26	1.20	2.3E-03	9.0E-02
ENSMUSG00000020873	Slc35b1	solute carrier family 35	0.26	1.20	3.8E-06	2.0E-03
ENSMUSG00000022838	Eaf2	ELL associated factor 2	0.26	1.20	1.2E-03	6.4E-02
ENSMUSG00000051238	Swsap1	SWIM type zinc finger 7 associated protein 1	0.26	1.20	7.3E-04	5.1E-02
ENSMUSG00000025894	Aasdhpt	aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase	0.26	1.20	2.4E-03	9.1E-02
ENSMUSG00000002014	Ssr4	signal sequence receptor, delta	0.26	1.20	2.6E-04	2.6E-02
ENSMUSG00000032114	Slc37a4	solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter), member 4	0.26	1.20	2.5E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000020952	Scfd1	Sec1 family domain containing 1	0.26	1.20	6.0E-04	4.4E-02
ENSMUSG00000032399	Rpl4	ribosomal protein L4	0.26	1.19	1.7E-04	2.3E-02
ENSMUSG00000039033	Tasp1	taspase, threonine aspartase 1	0.26	1.19	2.8E-03	9.6E-02
ENSMUSG00000021748	Pdhb	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	0.25	1.19	6.1E-04	4.5E-02
ENSMUSG00000031422	Morf4l2	mortality factor 4 like 2	0.25	1.19	1.4E-04	2.2E-02
ENSMUSG00000055850	Rnf181	ring finger protein 181	0.25	1.19	3.2E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000074656	Eif2s2	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (beta)	0.25	1.19	6.8E-04	4.8E-02
ENSMUSG00000030245	Golt1b	golgi transport 1 homolog B (S. cerevisiae)	0.25	1.19	3.9E-04	3.4E-02
ENSMUSG00000021877	Arf4	ADP-ribosylation factor 4	0.25	1.19	1.1E-03	6.0E-02
ENSMUSG00000020664	Dld	dihydrolipoamide dehydrogenase	0.25	1.19	1.1E-03	6.3E-02
ENSMUSG00000037072	Sep15	selenoprotein	0.25	1.19	2.1E-03	8.6E-02
ENSMUSG00000031171	Ftsj1	FtsJ homolog 1 (E. coli)	0.25	1.19	8.8E-04	5.5E-02
ENSMUSG00000086290	Snhg12	small nucleolar RNA host gene 12	0.25	1.19	3.1E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000032123	Dpagt1	dolichyl-phosphate acetylglucosaminephosphotransferase 1	0.25	1.19	8.0E-04	5.3E-02
ENSMUSG00000027822	Slc33a1	solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter), member 1	0.25	1.19	8.9E-05	1.7E-02
ENSMUSG00000028936	Rpl22	ribosomal protein L22	0.24	1.18	2.7E-03	9.5E-02
ENSMUSG00000022336	Eif3e	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E	0.24	1.18	2.5E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000008682	Rpl10	ribosomal protein L10	0.24	1.18	2.2E-03	8.8E-02
ENSMUSG00000031232	Magt1	magnesium transporter 1	0.24	1.18	1.1E-03	6.3E-02
ENSMUSG00000031711	Zfp330	zinc finger protein 330	0.24	1.18	9.8E-04	5.9E-02
ENSMUSG00000020484	Xbp1	X-box binding protein 1	0.24	1.18	2.1E-04	2.4E-02
ENSMUSG00000022323	Hrsp12	heat-responsive protein 12	0.24	1.18	2.0E-03	8.4E-02

ENSMUSG00000091512	Lamtor3	late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 3	0.24	1.18	3.1E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000018425	Dhx40	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40	0.24	1.18	3.2E-05	9.5E-03
ENSMUSG00000056260	Lrif1	ligand dependent nuclear receptor interacting factor 1	0.24	1.18	3.2E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000030057	Cnbp	cellular nucleic acid binding protein	0.23	1.18	9.0E-04	5.6E-02
ENSMUSG00000005973	Rcn1	reticulocalbin 1	0.23	1.18	3.1E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000027506	Tpd52	tumor protein D52	0.23	1.18	3.3E-03	1.0E-01
ENSMUSG00000047187	Rab2a	RAB2A, member RAS oncogene family	0.23	1.18	1.9E-03	8.3E-02
ENSMUSG00000021905	Dph3	diphthamine biosynthesis 3	0.23	1.17	3.7E-04	3.2E-02
ENSMUSG00000022365	Der1	Der1-like domain family, member 1	0.23	1.17	5.1E-10	2.9E-06
ENSMUSG00000044600	Smim7	small integral membrane protein 7	0.23	1.17	6.2E-05	1.4E-02
ENSMUSG00000053094	Tmem248	transmembrane protein 248	0.23	1.17	2.7E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000030983	Bccip	BRCA2 and CDKN1A interacting protein	0.23	1.17	2.7E-03	9.4E-02
ENSMUSG00000019814	Ltv1	LTV1 homolog (S. cerevisiae)	0.23	1.17	3.1E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000032263	Bckdhb	branched chain ketoacid dehydrogenase E1, beta polypeptide	0.23	1.17	2.6E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000018442	Der12	Der1-like domain family, member 2	0.23	1.17	1.6E-04	2.3E-02
ENSMUSG00000020457	Drg1	developmentally regulated GTP binding protein 1	0.23	1.17	2.0E-04	2.4E-02
ENSMUSG00000026111	Unc50	unc-50 homolog (C. elegans)	0.23	1.17	2.2E-03	8.8E-02
ENSMUSG00000060147	Serpinb6a	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6a	0.23	1.17	7.4E-04	5.1E-02
ENSMUSG00000020088	Sar1a	SAR1 gene homolog A (S. cerevisiae)	0.22	1.17	1.4E-03	7.0E-02
ENSMUSG00000026095	Asnsd1	asparagine synthetase domain containing 1	0.22	1.17	2.0E-04	2.4E-02
ENSMUSG00000057375	Yipf1	Yip1 domain family, member 1	0.22	1.16	7.9E-04	5.3E-02
ENSMUSG00000027828	Ssr3	signal sequence receptor, gamma	0.21	1.16	1.1E-04	1.9E-02
ENSMUSG00000002778	Kdelr1	KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 1	0.21	1.16	5.3E-05	1.3E-02
ENSMUSG00000060992	Copz1	coatamer protein complex, subunit zeta 1	0.21	1.16	2.9E-03	9.7E-02
ENSMUSG00000025724	Sec11a	SEC11 homolog A (S. cerevisiae)	0.21	1.16	2.9E-03	9.7E-02
ENSMUSG00000029152	Ociad1	OCIA domain containing 1	0.21	1.16	2.7E-03	9.4E-02
ENSMUSG00000029388	Eif2b1	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 (alpha)	0.20	1.15	1.7E-03	7.9E-02
ENSMUSG00000022136	Dnajc3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	0.20	1.15	9.4E-04	5.7E-02
ENSMUSG00000027509	Rae1	RAE1 RNA export 1 homolog (S. pombe)	0.20	1.15	2.2E-03	8.6E-02
ENSMUSG00000029390	Tmed2	transmembrane emp24 domain trafficking protein 2	0.20	1.15	1.3E-03	7.0E-02
ENSMUSG00000054619	Mettl7a1	methyltransferase like 7A1	0.20	1.15	8.3E-04	5.4E-02

ENSMUSG00000035297	Cops4	COP9 (constitutive photomorphogenic) homolog, subunit 4	0.19	1.14	7.6E-04	5.1E-02
ENSMUSG00000025465	Echs1	enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial	0.19	1.14	1.3E-03	6.7E-02
ENSMUSG00000037742	Eef1a1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	0.19	1.14	2.5E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000012117	Dhdds	dehydrodolichyl diphosphate synthase	0.19	1.14	5.6E-04	4.3E-02
ENSMUSG00000060904	Arl1	ADP-ribosylation factor-like 1	0.19	1.14	5.2E-04	4.2E-02
ENSMUSG00000056131	Pgm3	phosphoglucomutase 3	0.19	1.14	5.8E-04	4.3E-02
ENSMUSG00000021474	Sfxn1	sideroflexin 1	0.19	1.14	1.2E-03	6.6E-02
ENSMUSG00000024587	Nars	asparaginyl-tRNA synthetase	0.19	1.14	8.6E-04	5.5E-02
ENSMUSG00000038416	Cdc16	CDC16 cell division cycle 16	0.19	1.14	7.6E-04	5.1E-02
ENSMUSG00000002741	Ykt6	YKT6 homolog (S. Cerevisiae)	0.18	1.14	1.8E-04	2.3E-02
ENSMUSG00000003809	Gcdh	glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase	0.18	1.14	2.0E-03	8.4E-02
ENSMUSG00000001366	Fbxo9	f-box protein 9	0.18	1.13	7.4E-04	5.1E-02
ENSMUSG00000019795	Pcmt1	protein-L-isoaspartate	0.18	1.13	2.0E-03	8.4E-02
ENSMUSG00000028737	Aldh4a1	aldehyde dehydrogenase 4 family, member A1	0.18	1.13	2.0E-03	8.4E-02
ENSMUSG00000022707	Gbe1	glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1	0.18	1.13	1.4E-03	7.0E-02
ENSMUSG00000055943	Emc7	ER membrane protein complex subunit 7	0.17	1.13	1.4E-03	7.0E-02
ENSMUSG00000026526	Fh1	fumarate hydratase 1	0.17	1.13	3.2E-03	1.0E-01
ENSMUSG00000031913	Vps4a	vacuolar protein sorting 4a (yeast)	0.17	1.13	1.0E-03	6.0E-02
ENSMUSG00000068039	Tcp1	t-complex protein 1	0.17	1.13	2.5E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000041360	D19Bwg1357e	DNA segment, Chr 19, Brigham & Women's Genetics 1357 expressed	0.16	1.12	1.5E-03	7.3E-02
ENSMUSG00000056820	Tsnax	translin-associated factor X	0.14	1.10	2.6E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000021248	Tmed10	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast)	0.14	1.10	8.3E-04	5.4E-02
ENSMUSG00000020412	Ascc2	activating signal cointegrator 1 complex subunit 2	-0.17	0.89	2.6E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000018001	Cyth3	cytohesin 3	-0.20	0.87	2.8E-03	9.6E-02
ENSMUSG00000045639	Zfp629	zinc finger protein 629	-0.21	0.86	1.5E-04	2.3E-02
ENSMUSG00000004040	Stat3	signal transducer and activator of transcription 3	-0.21	0.86	2.6E-04	2.6E-02
ENSMUSG00000033545	Znrf1	zinc and ring finger 1	-0.25	0.84	2.9E-03	9.7E-02
ENSMUSG00000030323	Ift122	intraflagellar transport 122	-0.25	0.84	3.3E-03	1.0E-01
ENSMUSG00000030199	Etv6	ets variant 6	-0.26	0.84	2.1E-03	8.6E-02
ENSMUSG00000051413	Plagl2	pleiomorphic adenoma gene-like 2	-0.26	0.84	4.8E-04	4.0E-02
ENSMUSG00000029468	P2rx7	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7	-0.26	0.83	3.2E-03	9.9E-02

ENSMUSG00000018547	Pip4k2b	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, beta	-0.26	0.83	3.0E-03	9.8E-02
ENSMUSG00000035629	1700021K19Rik	RIKEN cDNA 1700021K19 gene	-0.27	0.83	2.1E-03	8.5E-02
ENSMUSG00000024589	Nedd4l	neural precursor cell expressed	-0.28	0.82	1.4E-03	7.0E-02
ENSMUSG00000005774	Rfx5	regulatory factor X, 5 (influences HLA class II expression)	-0.28	0.82	5.5E-04	4.3E-02
ENSMUSG00000018474	Chd3	chromodomain helicase DNA binding protein 3	-0.29	0.82	1.2E-05	4.6E-03
ENSMUSG00000017639	Rab11fip4	RAB11 family interacting protein 4 (class II)	-0.29	0.82	1.1E-03	6.2E-02
ENSMUSG00000006219	Fblim1	filamin binding LIM protein 1	-0.29	0.82	2.7E-03	9.3E-02
ENSMUSG000000037820	Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	-0.29	0.82	1.5E-03	7.3E-02
ENSMUSG00000025571	Tnrc6c	trinucleotide repeat containing 6C	-0.30	0.81	1.0E-03	6.0E-02
ENSMUSG00000020661	Dnmt3a	DNA methyltransferase 3A	-0.31	0.81	4.5E-05	1.2E-02
ENSMUSG00000071064	Zfp827	zinc finger protein 827	-0.32	0.80	1.8E-03	8.0E-02
ENSMUSG00000000275	Trim25	tripartite motif-containing 25	-0.32	0.80	2.7E-03	9.4E-02
ENSMUSG00000035547	Capn5	calpain 5	-0.33	0.80	1.7E-04	2.3E-02
ENSMUSG00000020787	P2rx1	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1	-0.33	0.80	2.8E-03	9.6E-02
ENSMUSG00000060716	Plekhh1	pleckstrin homology domain containing, family H member 1	-0.33	0.79	1.4E-03	7.2E-02
ENSMUSG00000032572	Col6a4	collagen, type VI, alpha 4	-0.34	0.79	1.8E-03	8.1E-02
ENSMUSG00000035299	Mid1	midline 1	-0.34	0.79	2.9E-04	2.9E-02
ENSMUSG00000031626	Sorbs2	sorbin and SH3 domain containing 2	-0.34	0.79	7.5E-04	5.1E-02
ENSMUSG00000027878	Notch2	notch 2	-0.34	0.79	1.9E-03	8.3E-02
ENSMUSG00000087381	Gm16008	predicted gene 16008	-0.34	0.79	2.3E-03	9.0E-02
ENSMUSG00000026980	Ly75	lymphocyte antigen 75	-0.35	0.78	2.8E-03	9.6E-02
ENSMUSG00000034575	Papd7	PAP associated domain containing 7	-0.35	0.78	2.0E-03	8.4E-02
ENSMUSG00000028980	H6pd	hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase)	-0.35	0.78	3.1E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000033767	D930015E06Rik	RIKEN cDNA D930015E06 gene	-0.36	0.78	4.3E-06	2.0E-03
ENSMUSG00000090100	Ttbk2	tau tubulin kinase 2	-0.36	0.78	2.1E-03	8.5E-02
ENSMUSG00000024754	Tmem2	transmembrane protein 2	-0.37	0.78	1.7E-04	2.3E-02
ENSMUSG00000052889	Prkcb	protein kinase C, beta	-0.37	0.77	1.4E-03	7.2E-02
ENSMUSG00000022178	Ajuba	ajuba LIM protein	-0.37	0.77	3.0E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000041757	Plekha6	pleckstrin homology domain containing	-0.38	0.77	1.0E-03	6.0E-02
ENSMUSG00000022421	Nptxr	neuronal pentraxin receptor	-0.38	0.77	1.6E-03	7.5E-02
ENSMUSG00000039982	Dtx4	deltex 4 homolog (Drosophila)	-0.38	0.77	2.1E-06	1.6E-03

ENSMUSG00000027778	Ift80	intraflagellar transport 80	-0.39	0.77	3.3E-03	1.0E-01
ENSMUSG00000037890	Wdr19	WD repeat domain 19	-0.39	0.76	1.0E-03	6.0E-02
ENSMUSG00000039765	Cc2d2a	coiled-coil and C2 domain containing 2A	-0.39	0.76	1.8E-03	8.1E-02
ENSMUSG00000004099	Dnmt1	DNA methyltransferase (cytosine-5) 1	-0.40	0.76	2.9E-06	1.9E-03
ENSMUSG00000001151	Pcnt	pericentrin	-0.40	0.76	1.3E-03	6.7E-02
ENSMUSG00000031075	Ano1	anoctamin 1, calcium activated chloride channel	-0.40	0.76	9.0E-04	5.6E-02
ENSMUSG00000041731	Pgm5	phosphoglucomutase 5	-0.40	0.76	3.0E-03	9.8E-02
ENSMUSG00000034573	Ptpn13	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13	-0.41	0.75	8.3E-04	5.4E-02
ENSMUSG00000036885	Arhgef26	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 26	-0.42	0.75	1.6E-03	7.5E-02
ENSMUSG00000021567	Nkd2	naked cuticle 2 homolog (Drosophila)	-0.42	0.75	7.4E-06	3.2E-03
ENSMUSG00000041688	Amot	angiomin	-0.42	0.75	5.3E-04	4.2E-02
ENSMUSG00000052974	Cyp2f2	cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 2	-0.42	0.75	3.1E-04	3.0E-02
ENSMUSG00000031328	Flna	filamin, alpha	-0.42	0.75	1.6E-03	7.7E-02
ENSMUSG00000026768	Itga8	integrin alpha 8	-0.43	0.74	1.8E-03	8.1E-02
ENSMUSG00000024462	Gabbr1	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1	-0.43	0.74	1.6E-04	2.3E-02
ENSMUSG00000029093	Sorcs2	sortilin-related VPS10 domain containing receptor 2	-0.44	0.74	2.4E-03	9.2E-02
ENSMUSG00000038252	Ncapd2	non-SMC condensin I complex, subunit D2	-0.44	0.74	3.1E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000009585	Apobec3	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 3	-0.44	0.73	8.7E-04	5.5E-02
ENSMUSG00000038963	Slco4a1	solute carrier organic anion transporter family, member 4a1	-0.45	0.73	3.0E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000005148	Klf5	Kruppel-like factor 5	-0.47	0.72	5.0E-04	4.0E-02
ENSMUSG00000032332	Col12a1	collagen, type XII, alpha 1	-0.47	0.72	6.5E-05	1.4E-02
ENSMUSG00000037816	Fbxw17	F-box and WD-40 domain protein 17	-0.48	0.72	7.0E-04	4.9E-02
ENSMUSG00000036986	Pml	promyelocytic leukemia	-0.49	0.71	2.2E-05	7.2E-03
ENSMUSG00000061576	Dpp6	dipeptidylpeptidase 6	-0.50	0.71	4.8E-04	4.0E-02
ENSMUSG00000015968	Cacna1d	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit	-0.50	0.71	1.1E-03	6.3E-02
ENSMUSG00000029999	Tgfa	transforming growth factor alpha	-0.50	0.70	1.4E-04	2.2E-02
ENSMUSG00000042331	Specc1	sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1	-0.51	0.70	1.7E-04	2.3E-02
ENSMUSG00000027951	Adar	adenosine deaminase, RNA-specific	-0.51	0.70	3.1E-03	9.9E-02
ENSMUSG00000026413	Pkp1	plakophilin 1	-0.51	0.70	2.1E-03	8.6E-02
ENSMUSG00000032596	Uba7	ubiquitin-like modifier activating enzyme 7	-0.52	0.70	4.1E-05	1.1E-02
ENSMUSG00000006476	Nsmf	NMDA receptor synaptonuclear signaling and neuronal migration factor	-0.52	0.70	5.3E-05	1.3E-02

ENSMUSG00000041936	Agrn	agrin	-0.52	0.70	3.0E-04	2.9E-02
ENSMUSG00000039501	Znfx1	zinc finger, NFX1-type containing 1	-0.52	0.70	1.8E-04	2.3E-02
ENSMUSG00000028028	Alpk1	alpha-kinase 1	-0.54	0.69	5.5E-04	4.3E-02
ENSMUSG00000013236	Ptpns	protein tyrosine phosphatase, receptor type, S	-0.55	0.68	1.9E-03	8.3E-02
ENSMUSG00000024302	Dtna	dystrobrevin alpha	-0.55	0.68	2.0E-04	2.4E-02
ENSMUSG00000052512	Nav2	neuron navigator 2	-0.58	0.67	4.2E-06	2.0E-03
ENSMUSG00000002324	Rec8	REC8 meiotic recombination protein	-0.60	0.66	2.6E-03	9.3E-02
ENSMUSG00000024421	Lama3	laminin, alpha 3	-0.61	0.66	1.5E-04	2.2E-02
ENSMUSG00000040624	Plekhg1	pleckstrin homology domain containing, family G member 1	-0.61	0.65	9.9E-04	5.9E-02
ENSMUSG00000028358	Zfp618	zinc finger protein 618	-0.62	0.65	3.2E-04	3.0E-02
ENSMUSG00000027580	Helz2	helicase with zinc finger 2, transcriptional coactivator	-0.63	0.65	2.3E-03	9.0E-02
ENSMUSG00000049502	Dtx3l	deltex 3-like (Drosophila)	-0.63	0.65	9.4E-04	5.7E-02
ENSMUSG00000046971	Pla2g4f	phospholipase A2, group IVF	-0.64	0.64	9.7E-07	9.1E-04
ENSMUSG00000030077	Chl1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM	-0.73	0.60	6.4E-05	1.4E-02
ENSMUSG00000030789	Itgax	integrin alpha X	-0.79	0.58	1.3E-03	6.9E-02
ENSMUSG00000070327	Rnf213	ring finger protein 213	-0.82	0.57	1.0E-03	5.9E-02
ENSMUSG00000069793	Slfn9	schlafen 9	-0.83	0.56	1.7E-04	2.3E-02
ENSMUSG00000032028	Nxpe2	neurexophilin and PC-esterase domain family, member 2	-0.87	0.55	1.6E-03	7.6E-02
ENSMUSG00000055415	Atp10b	ATPase, class V, type 10B	-1.00	0.50	2.4E-04	2.5E-02
ENSMUSG00000074151	Nlrc5	NLR family, CARD domain containing 5	-1.01	0.50	1.0E-04	1.8E-02
ENSMUSG00000073409	H2-Q6	histocompatibility 2, Q region locus 6	-1.09	0.47	1.1E-03	6.3E-02
ENSMUSG00000060550	H2-Q7	histocompatibility 2, Q region locus 7	-1.18	0.44	5.6E-04	4.3E-02
ENSMUSG00000036813	Entpd8	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8	-1.55	0.34	9.4E-06	3.7E-03
ENSMUSG00000032690	Oas2	2'-5' oligoadenylate synthetase 2	1.66	-0.32	6.1E-04	4.5E-02

FC: Fold Change; **Log₂FC:** Log na base 2 do fold change.

ANEXO 4 – Lista de genes diferencialmente expressos em animais tratados por trinta e duas semanas com dieta baseada em banha de porco quando comparado aos animais tratados com dieta baseada em óleo de linhaça. P-adj: 0,10.

Ensembl Gene ID	Gene Symbol	Gene Name	Log2FC	FC	p-value	p-adj
ENSMUSG00000052305	Hbb-bs	hemoglobin, beta adult s chain	1.81	3.50	1.0E-04	3.9E-02
ENSMUSG00000069917	Hba-a2	hemoglobin alpha, adult chain 2	1.79	3.46	2.0E-04	5.2E-02
ENSMUSG00000069919	Hba-a1	hemoglobin alpha, adult chain 1	1.78	3.43	2.6E-04	5.6E-02
ENSMUSG00000073940	Hbb-bt	hemoglobin, beta adult t chain	1.72	3.30	3.4E-04	6.6E-02
ENSMUSG00000002289	Angptl4	angiopoietin-like 4	1.15	2.22	3.4E-04	6.6E-02
ENSMUSG00000024125	Sbpl	spermine binding protein-like	1.11	2.16	3.4E-04	6.6E-02
ENSMUSG00000037071	Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	1.05	2.07	4.1E-04	7.6E-02
ENSMUSG00000037493	Cib2	calcium and integrin binding family member 2	0.56	1.48	1.0E-05	9.5E-03
ENSMUSG00000071506	Tmem139	transmembrane protein 139	0.56	1.48	9.3E-05	3.7E-02
ENSMUSG00000046410	Kcnk6	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily K, member 6	0.47	1.38	4.7E-04	8.4E-02
ENSMUSG00000008348	Ubc	ubiquitin C	0.44	1.36	6.9E-04	1.0E-01
ENSMUSG00000026864	Hspa5	heat shock protein 5	0.42	1.34	1.1E-04	4.0E-02
ENSMUSG00000078566	Bnip3	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3	0.42	1.34	2.2E-04	5.3E-02
ENSMUSG00000031770	Herpud1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible,	0.41	1.33	5.8E-04	9.3E-02
ENSMUSG00000023393	Slc17a9	solute carrier family 17, member 9	0.41	1.33	1.2E-04	4.0E-02
ENSMUSG00000032757	Bet1	blocked early in transport 1 homolog (S. cerevisiae)	0.40	1.32	2.2E-08	5.6E-05
ENSMUSG00000057069	Ero1lb	ERO1-like beta (S. cerevisiae)	0.40	1.32	1.2E-04	4.0E-02
ENSMUSG00000020581	Agr2	anterior gradient 2	0.40	1.32	1.1E-07	1.8E-04
ENSMUSG00000032575	Manf	mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	0.40	1.32	6.1E-04	9.5E-02
ENSMUSG00000041084	Ostc	oligosaccharyltransferase complex subunit	0.36	1.29	5.7E-04	9.2E-02
ENSMUSG00000032557	Uba5	ubiquitin-like modifier activating enzyme 5	0.35	1.27	3.1E-04	6.4E-02
ENSMUSG00000039197	Adk	adenosine kinase	0.35	1.27	2.0E-05	1.3E-02
ENSMUSG00000042682	Selk	selenoprotein K	0.34	1.27	2.0E-05	1.3E-02
ENSMUSG00000069633	Pex11g	peroxisomal biogenesis factor 11 gamma	0.33	1.26	5.0E-04	8.4E-02
ENSMUSG00000026189	Pecr	peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	0.32	1.25	4.2E-04	7.7E-02
ENSMUSG00000022838	Eaf2	ELL associated factor 2	0.32	1.25	7.0E-05	3.0E-02
ENSMUSG00000038871	Bpgm	2,3-bisphosphoglycerate mutase	0.32	1.25	4.3E-04	7.8E-02

ENSMUSG00000027808	Serp1	stress-associated endoplasmic reticulum protein 1	0.31	1.24	3.1E-05	1.7E-02
ENSMUSG00000024150	Mcfcd2	multiple coagulation factor deficiency 2	0.31	1.24	1.9E-09	9.6E-06
ENSMUSG00000021759	Ppap2a	phosphatidic acid phosphatase type 2A	0.30	1.23	2.6E-04	5.6E-02
ENSMUSG00000027746	Ufm1	ubiquitin-fold modifier 1	0.29	1.22	2.5E-05	1.5E-02
ENSMUSG00000035227	Spcs2	signal peptidase complex subunit 2 homolog (S. cerevisiae)	0.28	1.21	2.2E-04	5.3E-02
ENSMUSG00000054408	Spcs3	signal peptidase complex subunit 3 homolog (S. cerevisiae)	0.27	1.21	8.9E-07	1.2E-03
ENSMUSG00000028271	Gtf2b	general transcription factor IIB	0.27	1.20	2.6E-04	5.6E-02
ENSMUSG00000027822	Slc33a1	Solute carrier family 33	0.26	1.20	2.9E-05	1.6E-02
ENSMUSG00000027828	Ssr3	signal sequence receptor, gamma	0.26	1.20	2.3E-06	2.6E-03
ENSMUSG00000027879	Sec22b	SEC22 homolog B, vesicle trafficking protein	0.25	1.19	5.2E-04	8.7E-02
ENSMUSG00000022136	Dnajc3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	0.23	1.18	1.5E-04	4.4E-02
ENSMUSG00000018442	Derl2	Der1-like domain family, member 2	0.23	1.17	1.8E-04	4.9E-02
ENSMUSG00000022365	Derl1	Der1-like domain family, member 1	0.22	1.17	1.5E-09	9.6E-06
ENSMUSG00000018474	Chd3	chromodomain helicase DNA binding protein 3	-0.22	0.86	6.4E-04	9.6E-02
ENSMUSG00000030207	8430419L09Rik	RIKEN cDNA 8430419L09 gene	-0.24	0.85	5.7E-04	9.2E-02
ENSMUSG00000040605	Bace2	beta-site APP-cleaving enzyme 2	-0.26	0.84	6.5E-04	9.6E-02
ENSMUSG00000045639	Zfp629	zinc finger protein 629	-0.28	0.82	8.1E-07	1.2E-03
ENSMUSG00000033767	D930015E06Rik	RIKEN cDNA D930015E06 gene	-0.29	0.82	2.1E-04	5.2E-02
ENSMUSG00000030849	Fgfr2	fibroblast growth factor receptor 2	-0.34	0.79	4.8E-04	8.4E-02
ENSMUSG00000059939	9430015G10Rik	RIKEN cDNA 9430015G10 gene	-0.35	0.79	1.2E-04	4.0E-02
ENSMUSG00000039982	Dtx4	deltex 4 homolog (Drosophila)	-0.35	0.78	1.2E-05	1.0E-02
ENSMUSG00000040170	Cib2	calcium and integrin binding family member 2	-0.38	0.77	7.8E-04	1.1E-01
ENSMUSG00000042700	Sipa11i	signal-induced proliferation-associated 1 like 1	-0.40	0.76	5.0E-04	8.4E-02
ENSMUSG00000032596	Uba7	ubiquitin-like modifier activating enzyme 7	-0.43	0.74	6.4E-04	9.6E-02
ENSMUSG00000047907	Tshz2	teashirt zinc finger family member 2	-0.44	0.74	6.1E-04	9.5E-02
ENSMUSG00000031075	Ano1	anoctamin 1, calcium activated chloride channel	-0.45	0.73	1.8E-04	4.9E-02
ENSMUSG00000004151	Etv1	ets variant 1	-0.48	0.72	2.1E-04	5.2E-02
ENSMUSG00000006476	Nsmf	NMDA receptor synaptonuclear signaling and neuronal migration factor	-0.49	0.71	1.2E-04	4.0E-02
ENSMUSG00000039765	Cc2d2a	coiled-coil and C2 domain containing 2A	-0.50	0.71	6.1E-05	2.8E-02
ENSMUSG00000046794	Ppp1r3b	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B	-0.50	0.71	8.3E-05	3.5E-02
ENSMUSG00000042499	Hoxd11	homeobox D11	-0.51	0.70	5.5E-05	2.6E-02

ENSMUSG00000052512	Nav2	neuron navigator 2	-0.51	0.70	5.1E-05	2.5E-02
ENSMUSG00000045875	Adra1a	adrenergic receptor, alpha 1a	-0.51	0.70	7.5E-04	1.1E-01
ENSMUSG00000037816	Fbxw17	F-box and WD-40 domain protein 17	-0.53	0.69	2.2E-04	5.3E-02
ENSMUSG00000049336	Tenm2	teneurin transmembrane protein 2	-0.55	0.68	2.4E-04	5.6E-02
ENSMUSG00000038963	Slco4a1	solute carrier organic anion transporter family, member 4a1	-0.55	0.68	2.7E-04	5.7E-02
ENSMUSG00000009585	Apobec3	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 3	-0.60	0.66	7.4E-06	7.7E-03
ENSMUSG00000024421	Lama3	laminin, alpha 3	-0.61	0.65	1.4E-04	4.3E-02
ENSMUSG00000026413	Pkp1	plakophilin 1	-0.63	0.65	1.8E-04	4.9E-02
ENSMUSG00000052974	Cyp2f2	cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 2	-0.66	0.63	1.5E-08	5.0E-05
ENSMUSG00000017607	Tns4	tensin 4	-0.67	0.63	1.9E-05	1.3E-02
ENSMUSG00000042942	Greb1l	growth regulation by estrogen in breast cancer-like	-0.71	0.61	2.7E-04	5.7E-02
ENSMUSG00000046971	Pla2g4f	phospholipase A2, group IVF	-0.71	0.61	4.3E-08	8.9E-05
ENSMUSG00000030077	Chl1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM	-0.74	0.60	5.0E-05	2.5E-02
ENSMUSG00000032028	Nxpe2	neurexophilin and PC-esterase domain family, member 2	-0.94	0.52	6.6E-04	9.6E-02
ENSMUSG00000013418	B4galnt2	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 2	-1.02	0.49	1.4E-04	4.3E-02
ENSMUSG00000036813	Entpd8	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8	-1.49	0.36	2.0E-05	1.3E-02

FC: Fold Change; **Log₂FC:** Log na base 2 do fold change.

ANEXO 5 – Protocolo comitê de ética



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado Alterações fenotípicas na próstata de camundongos C57/BL6 submetidos a dietas compostas por diferentes perfis lipídicos: Mecanismos e alterações epigenéticas (protocolo CEUA/UNICAMP nº 3346-1), de responsabilidade da Prof. Dr. Hernandes Faustino Carvalho / Danilo Lopes Ferrucci, teve seu título alterado para Dietas com diferentes perfis lipídicos alteram o transcriptoma e o crescimento da próstata, por solicitação do responsável, tendo em vista a adequação do título aos resultados trabalho.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 07/04/2014.

Campinas, 04 de fevereiro de 2016.

Profa. Dra. Liana M. C. Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

ANEXO 6 – Declaração: Bioética e Biossegurança



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13063-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6376, e-mail: cpg@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "*Dietas com diferentes perfis lipídicos alteram o transcriptoma e o crescimento da próstata*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: _____

Nome do(a) aluno(a): Danilo Lopes Ferrucci

Assinatura: _____

Nome do(a) orientador(a): Hernandes Faustino de Carvalho

Data: 04/02/2016

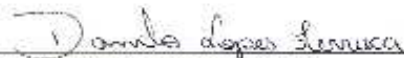
ANEXO 7 – Declaração: direito autoral

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Dietas com diferentes perfis lipídicos alteram o transcriptoma e o crescimento da próstata**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 04 de fevereiro de 2016

Assinatura:



Nome do(a) autor(a): **Danilo Lopes Ferrucci**

RG n.º 33.509.886-1

Assinatura:



Nome do(a) orientador(a): **Hernandes Faustino de Carvalho**

RG n.º 32.190.095-8