



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

JÉSSICA STEPHANY FERNANDES DO VALE

**EFEITO DO EXTRATO DE JABUTICABA NA PROGRESSÃO DO
ADENOCARCINOMA NO LOBO ANTERIOR DA PRÓSTATA EM
CAMUNDONGOS TRAMP ASSOCIADO A INGESTÃO DE DIETA
HIPERLIPÍDICA**

CAMPINAS
2019

JÉSSICA STEPHANY FERNANDES DO VALE

**EFEITO DO EXTRATO DE JABOTICABA NA PROGRESSÃO DO ADENOCARCINOMA NO LOBO
ANTERIOR DA PRÓSTATA EM CAMUNDONGOS TRAMP ASSOCIADO A INGESTÃO DE DIETA
HIPERLIPÍDICA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em
Biologia Celular e Estrutural, na Área de Biologia Celular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA JÉSSICA STEPHANY
FERNANDES DO VALE E ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a. VALÉRIA
HELENA ALVES CAGNON QUITETE.

CAMPINAS
2019

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

V234e Vale, Jéssica Stephany Fernandes do, 1990-
Efeito do extrato de jaboticaba do adenocarcinoma no lobo anterior da próstata em camundongos TRAMP associados a ingestão de dieta hiperlipídica
/ Jéssica Stephany Fernandes do Vale. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Próstata. 2. Hormônios. 3. Jaboticaba. 4. Sobrepeso. 5. Polifenóis. I. Cagnon, Valéria Helena Alves, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of jaboticaba extract on adenocarcinoma progression in anterior lobe of TRAMP mice prostate associated with intake of hig-fat diet

Palavras-chave em inglês:

Prostate
Hormones
Jaboticaba
Overweight
Pholypenols

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Valéria Helena Alves Cagnon Quitete [Orientador]

Luciana Bolsoni Lourenço

Raquel Frenedoso da Silva

Data de defesa: 10-12-2019

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0664-6617>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5620072618595974>

Campinas, 10 de dezembro de 2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª. Drª. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Profª. Drª. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Drª. Raquel Frenedoso da Silva

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

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Biologia Celular e Estrutural da Unidade Instituto de Biologia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo o esforço e abdicação de si mesmas para que eu pudesse obter a melhor educação, formação e me tornasse o melhor de mim.

Às minhas mães, **Neusa Maria Alves** por acolher de coração aberto uma nova integrante na família, mesmo quando esta já era grande, e à **Jucelene Fernandes do Vale** por discernir e aceitar o momento de dizer adeus.

Às minhas irmãs **Andréia** e **Andreza de Castro** pela companhia, o auxílio em minha criação e o suporte familiar, emocional e financeiro que permitiram chegar até aqui.

Aos meus irmãos **André** e **Alexandre de Castro** pela companhia e ensinamentos ao longo dos anos.

Aos meus sobrinhos **Kauan**, **Yuan** e **Ettore** por todos os momentos felizes que vivenciamos juntos, que me tornaram um ser humano mais responsável por mim e pelo próximo.

Ao meu noivo, **Caio Correia Vasconcelos**, pela companhia ao longo destes anos, pelo apoio incondicional em todas as minhas escolhas e por me auxiliar nos momentos de escuridão ao longo desta caminhada.

À **Profª. Drª. Valéria Helena Cagnon Quitete**, que me recebeu em seu laboratório, me orientando com todo seu conhecimento, sempre me incentivando na busca pelo aprendizado, estando sempre disponível e sem nunca medir esforços para me auxiliar.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Biologia da Reprodução, por todo o conhecimento técnico e pessoal que compartilhamos. À **Ellen**, por dividir comigo sua experiência, conhecimento e material para o desenvolvimento desta dissertação. À **Andressa**, por todas as histórias, risadas e suporte emocional durante esta jornada. À **Isabela**, por todas as imunos realizadas, a resignificação de Avril Lavigne e todos os momentos de auxílio técnico e intelectual. À **Celina**, por desenvolver o extrato que permitiu o desenvolvimento desta dissertação e por contagiar nosso dia-a-dia com sua alegria e sorriso contagiante. À **Giovana**, pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório. À **Larissa**, por todo o auxílio intelectual e técnico proporcionado em momentos de desesperança. Ao **Fábio**, pelo exemplo de pesquisador a seguir. Ao **Felipe**, por sua paz e calma diária.

Às integrantes da banca examinadora, **Profª. Drª. Luciana Bolsoni Lourenço**, **Drª. Raquel Frenedoso da Silva**, **Drª. Adriana Fogagnolo Mauricio** e **Drª. Gabriela Bortolança Chiarotto**,

pelo aceite e disponibilidade em participar desta banca e pelo interesse e dedicação constante no desenvolvimento do conhecimento, aprendizado e pesquisa.

À **Mariana Piccoli Gonçalves** (*Tia Gap*) pela sororidade e companhia que nos acompanham desde a graduação, e por me estender a mão em todos os momentos que necessitei.

Aos amigos **Felipe** (*Batata*), **Isabel** (*Esparta*), **Diego** (*Bagaço*) e **Marjorie** que estão aqui representando tantos outros colegas, por todas as festas organizadas e comparecidas, os momentos de descontração ao longo deste mestrado e por nunca medirem esforços para me lembrarem de que eu sou capaz.

Aos **colegas de graduação da turma 012N** por termos permanecidos juntos e unidos até na pós-graduação, nos incentivando sempre a seguir em frente.

Aos professores do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas que colaboraram de diversas maneiras para minha formação intelectual durante a graduação, em especial à **Prof^a. Dr^a. Lúcia Maria Elvira Alves** e à **Prof^a. Dr^a. Cristina Pontes Vicente**, que são exemplo de docentes a ser seguido.

Aos **técnicos** do Departamento de Biologia Celular e Estrutural, que forneceram ferramentas importantes para a concretização desse trabalho.

À secretaria de Pós-Graduação do Instituto de Biologia, pelo suporte durante o desenvolvimento deste trabalho. Em especial, à **Líliam Alves Senne Panagio**, ao **Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel** e à **Prof^a. Dr^a. Elaine Minatel**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Processo: 1694856)** e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processos: 18/04579-7 e 15/25714-1)**, pelo suporte financeiro e incentivo à pesquisa.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural (PPG-BCE)** e à **Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)**, pela excelência no ensino e no desenvolvimento da ciência.

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

RESUMO

O câncer de próstata (PCa) é o mais diagnosticado em homens e ocupa o segundo lugar no *ranking* de incidência no mundo. O consumo de dieta hiperlipídica (HFD) promove o sobrepeso, acúmulo de gordura abdominal, acarreta alterações no microambiente prostático, induz o estresse oxidativo, o aumento da proliferação celular e de processos inflamatórios. A casca da Jabuticaba apresenta compostos fenólicos e antocianinas em grandes quantidades, conhecidos por seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e anti-cancerígenos, os quais tem sido avaliado no tratamento de lesões da próstata. Este presente estudo tem como objetivo caracterizar os efeitos do extrato da casca da Jabuticaba (ECJ) sobre a progressão do câncer no lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP (*do inglês, transgenic adenocarcinoma of mouse prostate*), associado ao consumo de dieta hiperlipídica.

Para isto, 50 camundongos TRAMP foram divididos em cinco grupos experimentais: controle de 08 e 16 semanas que receberam ração normolipídica (C8 e C16, respectivamente), controle de 16 semanas de idade que receberam dieta normolipídica (CH), tratado de 16 semanas de idade que recebeu ração normolipídica e consumiu ECJ (JC) e tratado de 16 semanas de idade que recebeu ração HFD e consumiu ECJ (JH). Ao término do tratamento, o lobo anterior da próstata foi coletado para análise morfológica, imunoreatividade e quantificação dos níveis proteicos de α -actina, receptor de andrógenos (AR), receptor de estrógenos *alpha* (ER α), prolactina, FGFR3, PCNA, VEGF e TGF- β .

Os animais que receberam dieta normolipídica apresentaram menor severidade das lesões proliferativas da próstata anterior. O consumo de dieta hiperlipídica promoveu alterações hormonais com aumento de AR e PR, além de alterações estromais relacionadas ao aumento de fatores angiogênicos, de crescimento e proliferação, como VEGF, TGF-B e FGFs. Já alterações significativas na distribuição da α -actina não foram identificadas no tecido glandular. A administração do ECJ foi benéfica, diminuindo os processos proliferativos e reduzindo os efeitos nocivos causados pela HFD a um nível similar ao grupo C16.

Assim, a dieta hiperlipídica foi fator prejudicial para o lobo anterior da próstata dos camundongos TRAMP, promovendo a aceleração das lesões proliferativas com consequente progressão do adenocarcinoma do lobo anterior da próstata. O ECJ promoveu reparo tecidual

no lobo anterior prostático, apresentando resposta tecidual de maior intensidade em tecidos com drástico desequilíbrio, como o pelo consumo da HFD.

ABSTRACT

Prostate câncer (PCa) is the most diagnosed disease in men, and it's ranked as the second most common type of câncer around the world. Consumption of a high-fat diet (HFD) leads to overweight, abdominal fat accumulation and changes in the prostatic microenvironment, as well as inducing oxidative stress, increased cell proliferation and inflammatory processes. Jaboticaba peel presents phenolic compounds and anthocyanins in quantities, known for their anti-inflammatory and antioxidant effects, which have been evaluated in the treatment of prostate lesions. This study aims to characterize the effects of the Jaboticaba peel extract (ECJ) in the câncer progression in the anterior lobe (AL) of the prostate from TRAMP mice, associated with high-fat diet (HFD) intake.

For this, 50 TRAMP mice were divided into five groups: 08 and 16 week-old mice fed with a control diet (C8 and C16 groups), 16 week-old mice fed with HFD (CH group), 16 week-old mice which received ECJ (JC group), 16 week-old mice fed with HFD and receiving ECJ (JH group). After the treatment, the anterior lobe of the prostate was collected for morphological analysis, immulabelling evaluations and protein level quantification of α -actin, androgen receptor (AR), estrogen receptor alpha (ER α), prolactin, FGFR3, PCNA, VEGF and TGF- β .

The experimental groups that received normolipid diet presented lower severity of anterior prostate proliferative lesions. Consumption of high-fat diet promoted hormonal changes with increased of AR and PR, as well as stromal changes related to increased growth and proliferation factors, such as VEGF, TGF-B and FGFs. Significant changes in α -actin distribution were not identified in glandular tissue. ECJ administration was beneficial, decreasing proliferative processes and reducing the harmful effects caused by HFD to a similar level to control group (C16).

Thus, the high-fat diet was detrimental factor to the anterior prostate lobe of TRAMP mice, leading to the acceleration of proliferative lesions with consequent progression of prostate anterior lobe adenocarcinoma. The ECJ promotes tissue repair in the prostate glandular tissue, presenting a higher intensity tissue response in tissues with drastic imbalance, such as that generated by HFD consumption.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Câncer e sua Generalidades	11
1.2. Obesidade, sobrepeso e seus efeitos sobre o câncer	12
1.3. Generalidades da Próstata	14
1.4. O modelo experimental	17
1.5. Moléculas e Hormônios relevantes para o microambiente prostático	19
1.6. Jabuticaba e suas propriedades	27
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo Geral:	31
3.2. Objetivos específicos:	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Animais e procedimento experimental	32
4.2. Preparação das dietas normolipídica e hiperlipídica	34
4.3. Preparação do extrato da casca de jabuticaba (ECJ).	35
4.3.1. Avaliação da composição do extrato da casca da Jabuticaba.	36
4.4. Avaliação do ganho de peso dos animais e consumo energético	36
4.5. Análise morfológica e morfométrica através de microscopia de luz	36
4.6. Imunomarcação de α -actina, ER α , FGFR-3 e PCNA.	38
4.7. Extração de Proteínas e Western Blotting	39
4.8. Análise Estatística	41
5. RESULTADOS	42
5.1. Análise morfológica e morfométrica através de microscopia de luz	42
5.2. Imunohistoquímica e Quantificação Proteica para α -actina, Receptor de Andrógeno (AR) e Estrógeno (ER α), Prolactina, Fator Transformante Beta (TGF- β), Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), Índice Proliferativo (PCNA) nos diferentes grupos experimentais	51
5.2.1. Determinação do índice proliferativo através da imunomarcação de PCNA	51
5.2.2. α -actina	54
5.2.3. RECEPTOR DE ANDRÓGENO (AR)	56
5.2.4. RECEPTOR DE ESTRÓGENO ALPHA (ER α)	57
5.2.5. PROLACTINA	60
5.2.6. FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)	61
5.2.7. RECEPTOR 3 DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLÁSTICO (FGFR3)	62
5.2.8. FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- β)	65
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÕES	89
7.1. Conclusões Gerais	89
7.2. Conclusões Específicas	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
9. ANEXOS	115
9.1. Certificado Comitê de Ética no Uso de Animais	115
9.2. Declaração de Direitos Autorais	116

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer e sua Generalidades

Câncer é um termo genérico que representa um conjunto de mais de cem doenças, incluindo tumores malignos de diferentes localizações, originado por alterações em genes responsáveis pelo controle do funcionamento, crescimento e divisão celular, que podem levar a divisão repetida e descontrolada de células, podendo tomar por completo um ou mais tecidos (CURRIE, 1989; RICHARDSON, 1997; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015; WORLD HEALTH ORGANISATION, 2018; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Diferentes variáveis, como a exposição a fatores de risco, susceptibilidade genética, hábitos de vida e o meio ambiente estão intrinsecamente relacionadas ao desenvolvimento de câncer nas populações (MUIR, 1990; RICHARDSON, 1997; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2017; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Atualmente, há tendência de aumento de casos de diferentes tipos de câncer, constituindo um grave problema de saúde pública mundo. (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2017; BRAY et al., 2018; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019). O câncer acometeu cerca de 18 milhões de pessoas no mundo, sendo que no Brasil foram registradas 228 mil mortes em 2017 (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2019). A estimativa é que em 2019, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer, fossem diagnosticados 68 mil novos casos de câncer de próstata no Brasil, estimando-se mais de 15 mil mortes neste ano (BRAY et al., 2018; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2019). No âmbito mundial, o câncer de próstata encontra-se em segundo lugar no ranking de incidência e o quinto em mortalidade entre os homens (BRAY et al., 2018; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2019). De acordo com o GLOBOCAN 2018, anualmente 1,2 milhão de novos casos por ano de câncer de próstata são registrados no mundo com cerca de 359 mil mortes e constitui a segunda maior causa de mortes por câncer entre homens ocidentais (BRAY et al., 2018).

1.2. Obesidade, sobrepeso e seus efeitos sobre o câncer

A obesidade é uma doença crônica não transmissível caracterizada pelo excesso de gordura corporal, resultante da interação entre fatores heterogênicos decorrentes do comportamento alimentar, atividade física e fatores determinantes individuais do gasto energético (BIANCHINI; KAAKS; VAINIO, 2002; BUTLAND et al., 2007; HUBERT, 1982; JASTREBOFF et al., 2019). A obesidade pode ter origens diversas, como fatores genéticos, distúrbios neuroendócrinos como desbalanço hormonal e distúrbios hipotalâmicos, fatores mentais, como depressão e ansiedade (FRIEDMAN, 2009; VAN DER VALK et al., 2019). Dentre estes fatores, os maus hábitos de vida e alto consumo de alimentos gordurosos contribuem para o acúmulo de gordura corporal e, conseqüentemente, favorecem o sobrepeso e agravamento de quadros de obesidade (FRIEDMAN, 2009; KOPELMAN, 2000; VAN DER VALK et al., 2019).

Atualmente, a obesidade destaca-se como um grande problema de saúde pública atingindo proporções globais (NG et al., 2014; GURNANI; BIRKEN; HAMILTON, 2015; SMITH; SMITH, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). No Brasil, aproximadamente 56% dos brasileiros com 18 anos ou mais estão acima do peso de acordo com a Vigilância de Fatores de Risco e Proteção de Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) realizada pelo Ministério da Saúde em 2018. Ainda, a frequência de homens brasileiros adultos obesos é de 19% e 58% estão com sobrepeso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

O excesso de gordura corporal está relacionado ao desenvolvimento de doenças metabólicas (diabetes mellitus tipo 2 e doença hepática gordurosa), cardiovasculares (hipertensão, infarto do miocárdio e derrames), osteometabólicas (osteoporose e osteoartrite), Alzheimer, depressão e doenças respiratórias, como a asma (GARCIA-RIO et al., 2019; HUBERT, 1982; MACMAHON et al., 2009; OKOSUN et al., 2000; WILLETT et al., 1995). A relação entre o câncer e a obesidade está bem documentada (ARSLAN; ATILGAN; YAVAŞOĞLU, 2009; MADMOLI et al., 2019; TOBIAS PISCHON, 2008; XU et al., 2003), caracterizando como fator de risco para alguns tipos de cânceres, como o endometrial, gastrointestinal, de mama pós-menopausa, cólon,

adenocarcinoma de esôfago e de próstata (ALLOTT; MASKO; FREEDLAND, 2013; BASEN-ENGQUIST; CHANG, 2011; BHASKARAN et al., 2014; MADMOLI et al., 2019; PARIKESIT et al., 2016; PRICE et al., 2012; RENEHAN et al., 2008; SNOWDON; PHILLIPS; CHOI, 1984).

O acúmulo de gordura é capaz de promover alterações locais e sistêmicas. Aumento de tecido adiposo justaposto ao tecido mamário, foi considerado influenciador no desenvolvimento do câncer de mama por produzir e aumentar os níveis de hormônios esteroides, responsáveis pela carcinogênese neste tipo de câncer (GÉRARD; BROWN, 2018). Para a próstata, o acúmulo de gordura visceral é conhecido por ser danoso se comparado ao acúmulo geral de gordura, por ser capaz de produzir modificações hormonais e sistêmicas gerando inflamações locais, facilitando o desenvolvimento de hiperplasia prostática (BIRBACH et al., 2011; PONGCHAIYAKUL et al., 2005).

O sobrepeso e a obesidade são capazes de influenciar o desenvolvimento e progressão do câncer de próstata através de acúmulo de lipídeos, sinalização de fatores de crescimento, inflamação e modulação endócrina (NARITA et al., 2019; PARIKESIT et al., 2016). A aromatase é uma enzima que está presente em células que respondem aos hormônios estrogênicos, como o tecido adiposo e prostático, realizando a conversão da testosterona em estrógeno. No tecido adiposo, o estrógeno promove a adipogênese. O aumento em volume do tecido adiposo associado à ação aumentada da aromatase, desencadeará a redução dos níveis dos hormônios androgênicos, favorecendo o desenvolvimento de hiperplasia prostática e lesões pré-neoplásicas (ALLOTT; MASKO; FREEDLAND, 2013; BROWN et al., 2010; PARIKESIT et al., 2016; VENKATESWARAN; KLOTZ, 2010; WILLIAMS, 2012).

1.3. Generalidades da Próstata

A próstata é uma glândula sexual acessória masculina andrógeno-dependente situada na cavidade peritonial, posteriormente à sínfise púbica, inferiormente à bexiga urinária, anteriormente ao reto e ao redor da uretra, sendo atravessada em toda sua extensão pela uretra prostática (Figura 1) (AUMÜLLER; SEITZ, 1990; JESIK; HOLLAND; LEE, 1982; LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAUM, 2011). O tecido prostático é composto por células epiteliais, as quais conferem sua capacidade secretora, musculatura lisa e tecido conjuntivo, compondo o estroma (AUMÜLLER; SEITZ, 1990; MARKER et al., 2003).

Esta glândula produz uma secreção composta por diferentes constituintes como ácido cítrico, espermina, prostaglandinas, fosfatase ácida e zinco (HUGGINS; SCOTT; HEINEN, 1942). Denominada secreção prostática, é liberada na porção prostática da uretra, compondo o líquido seminal, propiciando um meio favorável para a motilidade, nutrição e sobrevivência dos espermatozoides (BULL et al., 2001; LIN; BISSELL, 1993; MARKER et al., 2003; TAYLOR; RISBRIDGER, 2008).

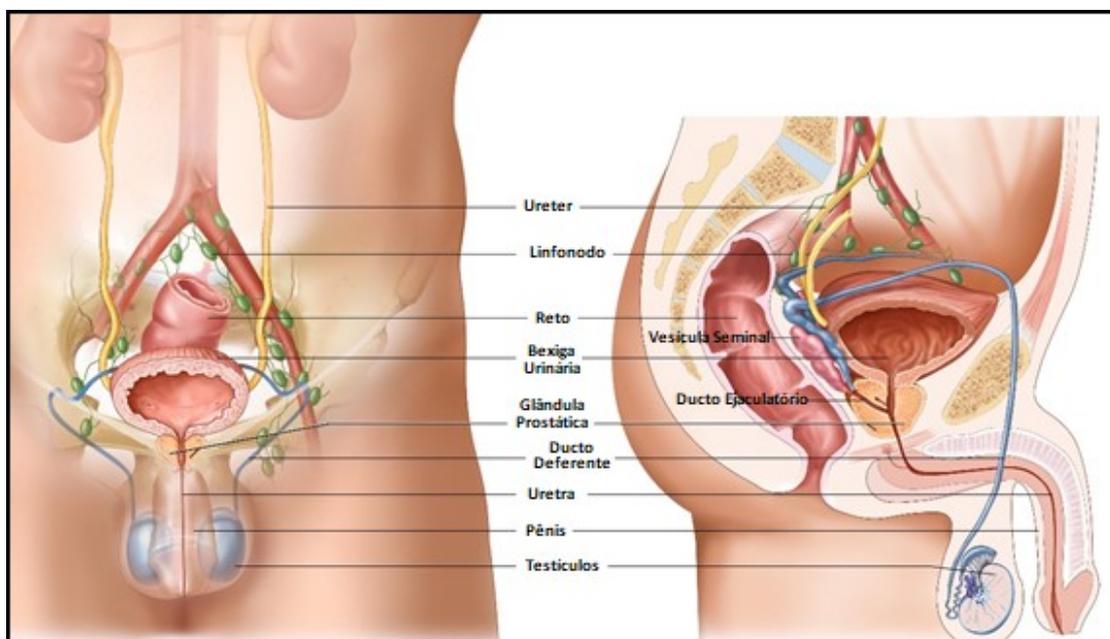


FIGURA 1 - Representação esquemática da localização da próstata posteriormente à sínfise púbica, inferiormente à bexiga urinária, anteriormente ao reto e ao redor da uretra, sendo atravessada em toda sua extensão pela uretra prostática no sistema urogenital masculino (National cancer institute, USA, traduzido).

Em roedores, a próstata divide-se em três pares de lobos: ventral, lateral e dorsal de acordo com a localização ao redor da uretra prostática, além de um par de glândulas coaguladoras, também conhecida como próstata anterior, localizadas na face côncava das vesículas seminais (Figura 2A)(AUMÜLLER; SEITZ, 1990; LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAUM, 2011; MARKER et al., 2003; SUGIMURA; CUNHA; DONJACOUR, 1986). Devido as diferenças específicas para cada lobo prostático nos padrões de ramificação na morfogenia e na dependência hormonal, o formato, histologia e características de cada lobo são distintas: o lobo anterior possui características histológicas distintas com extensivos dobramentos epiteliais, o lobo dorsolateral possui menos dobramentos epiteliais, enquanto o lobo ventral possui poucos dobramentos (figura 2A) (COLOMBEL; BUTTYAN, 1995; COSTELLO; FRANKLIN, 1994; LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAUM, 2011; MARKER et al., 2003).

Com relação as características histológicas, cada lobo prostático é composto por um conjunto de estruturas túbulo-alveolares, revestidos por epitélio secretor simples e envoltos por tecido estromal (AUMÜLLER; ADLER, 1979; MARKER et al., 2003). Uma membrana basal separa o epitélio do estroma, (Figura 2B) tendo como seus principais componentes o colágeno tipo IV e a laminina (MARKER et al., 2003).

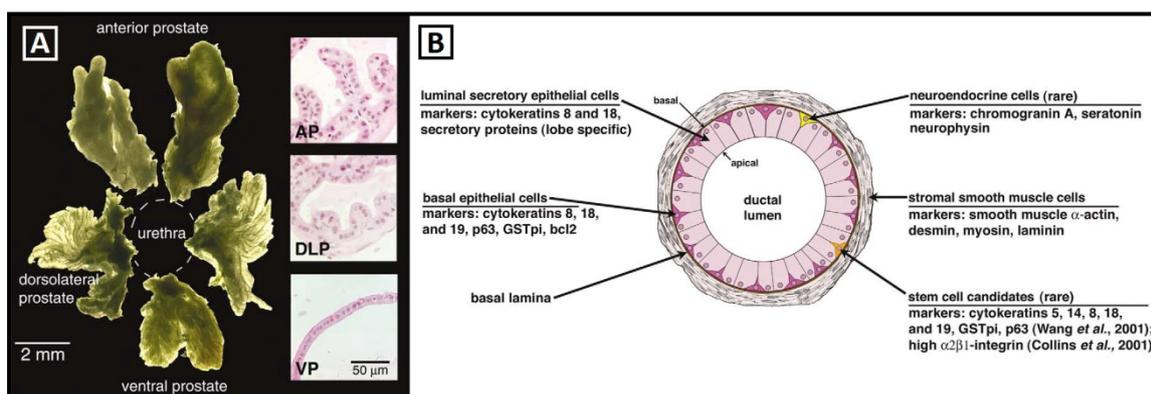


FIGURA 2 - A) Lobos da próstata de camundongo adulto juntamente com secções dos ductos prostáticos de cada lobo, mostradas em micrografias de inseto coradas com Hematoxilina e Eosina. Cada lobo tem um formato e aparência histológica distintos. **B) Diagrama de secção de ducto secretor**, indicando os tipos celulares presentes nos ductos prostáticos e seus respectivos marcadores, incluindo células epiteliais secretoras luminais, células epiteliais basais, células neuroendócrinas e células musculares estromais (MARKER et al, 2003)

O epitélio da próstata é formado por três tipos celulares: a) células do lúmen ou glandulares, que são o tipo celular mais frequente e constituem a porção exócrina da próstata, responsáveis pela secreção de proteínas (DE MARZO et al., 1999); b) células basais, que são relativamente indiferenciadas não demonstrando atividade secretora e c) células neuroendócrinas (Figura 2B) (MCNEAL, 1988).

O estroma prostático, por sua vez, é formado por um arranjo complexo de células estromais e matriz extracelular, com presença vasta de fatores de crescimento, moléculas reguladoras e enzimas de remodelação, que provêm sinais biológicos gerais e exercem influências mecânicas sobre as células epiteliais (CUNHA; MATRISIAN, 2002). Além disso, é uma região vascularizada, com terminações nervosas, e presença de células do sistema imune (TUXHORN; AYALA; ROWLEY, 2001). Os fibroblastos e as células musculares lisas são importantes tipos celulares do estroma prostático, sendo responsáveis por sintetizar componentes estruturais e reguladores da matriz extracelular.

A matriz extracelular é uma rede de proteínas fibrilares, glicoproteínas adesivas e proteoglicanos (KREIS; VALE, 1999; LIN; BISSELL, 1993; TUXHORN; AYALA; ROWLEY, 2001), e atua como um reservatório de fatores de crescimento ativos e latentes (TAIPALE; KESKI-OJA, 1997; TUXHORN; AYALA; ROWLEY, 2001). Além disso, componentes estruturais, como fibras colágenas e fibras elásticas, proporcionam rigidez mecânica e flexibilidade ao tecido. As células estromais e matriz extracelular criam um microambiente que regula o crescimento e diferenciação funcional das células adjacentes, desempenhando cada um desses, importante papel na manutenção da forma e função tecidual (CORNELL et al., 2003).

1.4. O modelo experimental

O TRAMP (*do inglês, transgenic adenocarcinoma of mouse prostate*), é um modelo experimental de camundongos geneticamente modificados desenvolvido por Greenberg em 1995 para o estudo do câncer de próstata (GREENBERG et al., 1995).

No modelo animal selvagem, as células epiteliais prostáticas encontram-se sob o controle do gene promotor de probasina responsivo a hormônios androgênicos. No modelo TRAMP, estas células expressam a oncoproteína viral SV40 Antígeno T (TAg), bloqueando a atividade da retinoblastoma e da p53, produtos de genes supressores tumorais importantes, ocasionando o desenvolvimento uniforme e espontâneo do adenocarcinoma prostático (GREENBERG et al., 1995).

A expressão do gene promotor da probasina ocorre de inicialmente nos lobos ventral e dorsolateral da próstata, com relativa menor expressão na próstata anterior e nas vesículas seminais, desta maneira, o adenocarcinoma desenvolvido neste modelo experimental é altamente específico ao tecido prostático e órgãos do trato reprodutivo masculino (GINGRICH et al., 1996, 1999; GREENBERG, 1996; GREENBERG et al., 1995; HUSS et al., 2001).

A expressão diferenciada do gene da probasina associado as diferentes influências sofridas pelos lobos prostáticos e a vesícula seminal, acarretam no desenvolvimento e progressão de lesões pré-neoplásicas e do adenocarcinoma de próstata em diferentes velocidades conforme o envelhecimento (BERMAN-BOOTY et al., 2012; KAPLAN-LEFKO et al., 2003). Desta maneira, o modelo TRAMP permite análises e estudos de mecanismos de indução e prevenção em diferentes estágios do desenvolvimento e progressão de lesões pré-neoplásicas e adenocarcinoma de próstata. As lesões pré-neoplásicas ocorrem nos lobos anterior e dorsolateral em camundongos com 8 semanas de idade, enquanto o lobo anterior de mesma idade permaneceu em sua maioria saudável, tornando este lobo uma boa escolha para estudos para a progressão do adenocarcinoma de próstata (KAPLAN-LEFKO et al., 2003; KIDO et al., 2019).

Os tumores prostáticos desenvolvidos por esse modelo compartilham características com o câncer humano, incluindo a metástase à distância, progressão para a independência angiogênica e diferenciação neuroendócrina (CHIAVEROTTI et al., 2008).

Além da utilização deste modelo experimental in vivo, modelos xenográficos podem ser realizados injetando linhagens celulares tumorais (como TRAMP-C1 e TRAMP-C2) em camundongos machos não transgênicos nude como hospedeiros. Estas linhagens celulares também podem ser utilizadas e manipuladas geneticamente para análises in vitro (HURWITZ et al., 2001).

O adenocarcinoma se caracteriza por apresentar um tipo histológico bem definido e característico. As células epiteliais prostáticas apresentam hiperplasia prostática, caracterizada através de análises morfológicas, de acordo com as semanas de vida do modelo TRAMP (BERMAN-BOOTY et al., 2012; KIDO et al., 2019). Entre a 8ª e a 12ª semana de idade, as células epiteliais apresentam graus variados de neoplasia epitelial prostática (PIN, do inglês *prostatic intraepithelial neoplasia*) classificadas em PIN de baixo e alto grau, próximo da 18ª semana, os animais apresentam adenocarcinoma indiferenciado. Entre as 24 e 30 semanas, quase todos os animais TRAMP apresentam adenocarcinoma bem diferenciado com metástases. (BERMAN-BOOTY et al., 2012; GINGRICH et al., 1996, 1999; GREENBERG, 1996; KIDO et al., 2019; MATEUS et al., 2019; NOGUEIRA PANGRAZI et al., 2018).

1.5. Moléculas e Hormônios relevantes para o microambiente prostático

Os processos biológicos na próstata, tais como regulação da proliferação e diferenciação celular, atividade mitogênica, processos secretores e crescimentos tumorais são regulados e/ou influenciados por diferentes polipeptídios, como, por exemplo, fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs), fator de crescimento transformante (TGFs), fator de crescimento vascular endotelial (VEGFs), e α -actina, além de serem responsivos a hormônios como os andrógenos, estrógenos e a prolactina (CHUNG et al., 2005; CUNHA; MATRISIAN, 2002; ZHAO et al., 2002). Estes fatores de crescimento, seus receptores e os receptores hormonais atuam realizando a interação entre o epitélio e o estroma. O desequilíbrio nesta interação favorece a formação da hiperplasia prostática, levando ao câncer de próstata (CHUNG et al., 2005; CUNHA; MATRISIAN, 2002; ELLEM; RISBRIDGER, 2010; ZHAO et al., 2002).

Os Fatores de Crescimento Fibroblásticos (FGF) atuam no desenvolvimento, fisiologia e homeostase do organismo, incluindo a regulação de comportamentos celulares como a proliferação, angiogênese, diferenciação, sobrevivência e reparo celular (BHOWMICK; NEILSON; MOSES, 2004). Os FGFs regulam um amplo espectro de atividades biológicas através da ativação de quatro receptores tirosina quinases transmembrana (FGFRs numerados de 1 a 4) de alta afinidade e suas respectivas vias de sinalização intracelulares (LIN; WANG, 2010). Os FGFRs são expressos em diferentes tipos celulares, tornando a sinalização através dos FGFs susceptível a alterações e transformações neoplásicas como proliferação, sobrevivência e angiogênese tumoral (TURNER; GROSE, 2010).

Na próstata, os FGFs medeiam as interações entre os compartimentos estromal e epitelial. Variações na expressão do eixo de sinalização do FGF em qualquer compartimento prostático podem afetar o equilíbrio homeostático, ocasionando carcinogênese na próstata (LIN; WANG, 2010). Montico *et al.* (2015b), avaliando as respostas angiogênicas prostáticas em camundongos senis, demonstraram aumento na sinalização de FGF-2 no microambiente prostático associado ao desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas. Outros estudos indicam aumento relativo de receptores de

Fibroblásticos (FGFR2) em tecido epitelial prostático associado ao desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais prostáticas (PIN) em camundongos TRAMP (HUSS; BARRIOS; FOSTER, 2003).

Também, de acordo com Smith *et al.* (2002), a expressão de receptores hormonais como o de andrógeno (AR) de estrógeno (ER α) está relacionado ao alto nível de FGF-2 e FGF-7. Estudos mostraram que a expressão de FGF-7 no estroma prostático é induzida por andrógenos em cultura celular de seres humanos e ratos (PLANZ *et al.*, 1998).

Hetzel *et al.*, (2014)(HETZL *et al.*, 2014) mostraram que há um aumento na expressão do receptor de estrógeno alfa (ER α) e uma diminuição dos receptores de andrógeno (AR) e estrógeno beta (ER β) em tecido prostático de ratos senis. Neste mesmo estudo, aumento na expressão de FGFs foi verificado, sugerindo a interação entre os hormônios esteroides e a sinalização celular através dos fatores de crescimento.

Com relação ao TGF- β (Fator de Crescimento Transformante Beta), este é uma proteína que controla a proliferação, diferenciação celular e outras funções na maioria das células, apresentando importante papel em diversas doenças, como câncer. O TGF- β inibe a proliferação celular. Logo, reduções nos níveis de TGF- β ou nos níveis de seus receptores podem ocasionar aumento descontrolado da proliferação celular, podendo ocasionar o desenvolvimento de tumores (SHI; MASSAGUÉ, 2003). Este fator, também é conhecido por sua atuação pró-angiogênica, induzindo células estromais a secretar altos níveis de fatores, como por exemplo, os VEGF e FGF-2, promovendo a proliferação e migração celular e a angiogênese (SOULITZIS *et al.*, 2006; TUXHORN *et al.*, 2002a, 2002b; ZEISBERG *et al.*, 2007).

Também, Montico *et al.* (2015a) mostraram o aumento de TGF- β em camundongos senis, mas quanto aos camundongos TRAMP, houve o aumento deste fator em animais que apresentaram lesões neoplasias intraepiteliais prostáticas e com o decorrer do tempo, e conseqüentemente, o aumento do grau das lesões, houve uma diminuição da presença de TGF- β .

Com relação ao fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), esse é um importante fator pró-angiogênico, facilitador do processo de vascularização no ambiente tumoral (LEUNG et al., 1989), e é tido como o mais potente mediador da formação de novos vasos sanguíneos e das funções de células endoteliais. Esse fator atua como mitógeno sobre essas células, estimulando sua migração e protegendo-as da apoptose, além de aumentar a permeabilidade do endotélio vascular (VAN MOORSELAAR; VOEST, 2002).

O principal mediador das ações do VEGF (também conhecido como VEGFA) no epitélio prostático são dois receptores quinase de tirosina (RTKs) localizados na membrana das células endoteliais, o VEGFR1 e VEGFR2 (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; REYNOLDS; KYPRIANOU, 2006; VAN MOORSELAAR; VOEST, 2002). Há um terceiro receptor que pertence a mesma família de receptores quinase de tirosina (RTKs), denominado VEGFR3, responsável pela transdução de sinais de outros dois tipos de VEGF, o VEGFC e VEGFD, responsáveis pela regulação da angiogênese de vasos linfáticos (KARKKAINEN; MÄKINEN; ALITALO, 2002).

Na próstata normal foi identificado baixos níveis de VEGF, mas em condições patológicas e no câncer, aumento de sua reatividade foi observado, tanto nas células tumorais como no estroma (DOLL et al., 2001; MAZZUCHELLI et al., 2000; NOGUEIRA PANGRAZI et al., 2018). Este aumento dos níveis de VEGF pode ser relacionado ao aumento de fibroblastos no microambiente estromal (CAMPISI, 2005; DAVALOS et al., 2010).

A *alpha* actina de músculo liso (α SMA) é um membro da família de proteínas actinas que desempenha papel importante na motilidade, estrutura e integridade celular (HINZ, 2007; MICALLEF et al., 2012; NURMIK et al., 2019). A α SMA atua na cicatrização do reparo tecidual, gerando estresse mecânico através da contração dos miofibroblastos e regulação das fibras de estresse, proporcionando contração e maturação do tecido conectivo que se forma durante o processo de cicatrização da lesão (MICALLEF et al., 2012; NURMIK et al., 2019)

Os miofibroblastos são fibroblastos que apresentam um fenótipo intermediário entre fibroblastos e células musculares lisas, considerando a expressão de proteínas do citoesqueleto e aspectos ultra estruturais (GABBIANI; MAJNO, 1972; TOMAS et al., 2010; TUXHORN; AYALA; ROWLEY, 2001; TUXHORN et al., 2002a). Citocinas e fatores de crescimento, como IL-6 e TGF- β 1, tem importante atuação no reparo tecidual. TGF-B é conhecido por induzir a diferenciação dos miofibroblastos, além da expressão de α SMA, aumento da deposição de matriz extracelular (HINZ, 2007; MICALLEF et al., 2012)

O estroma reativo é caracterizado pela presença de dois componentes principais: os miofibroblastos e os fibroblastos associados ao câncer (CAF, do inglês *cancer-associated fibroblasts*) em resposta ao carcinoma, gerando sinais que favorecem a progressão tumoral devido a sua capacidade de aumentar a migração celular e alterar o metabolismo das células epiteliais tumorais (BARRON; ROWLEY, 2012; CRUZ-BERMÚDEZ et al., 2019; TOMMELEIN et al., 2015). Deste modo, os miofibroblastos e os CAFs geram uma modificação no tecido ao secretar diversos fatores de crescimento, proteases e citocinas que irão promover a proliferação, migração e sobrevivência celular, além do remodelamento da matriz extracelular, recrutamento de células inflamatórias e a indução de angiogênese (BARRON; ROWLEY, 2012; CRUZ-BERMÚDEZ et al., 2019; ROWLEY, 1999; TOMMELEIN et al., 2015; TUXHORN; AYALA; ROWLEY, 2001).

Ainda, Montico *et al.* (2015a) mostraram em camundongos senis que o desenvolvimento de estroma reativo na próstata ocorre naturalmente como resultado do envelhecimento. Seus resultados apresentados mostraram o aumento dos marcadores de estroma reativo, α -actina de músculo liso (α SMA) e vimentina, nos animais senis e TRAMP.

Referente à ação hormonal na próstata, é conhecido que as células epiteliais prostáticas são altamente dependentes de andrógenos para execução de diversas funções importantes, como morfogênese, manutenção de atividade funcional, além da morfologia, proliferação e diferenciação das células epiteliais (IMAMOV et al., 2005; ROY et al., 1998).

A testosterona é o principal hormônio androgênico circulante (MELMED et al., 2016). No sangue, encontra-se associado a proteína albumina e a glicoproteína globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG), pouco sendo encontrada dissolvida no soro. É produzida e secretada pelos testículos, mas também pode ser produzida pela conversão de hormônios esteróides (QUIGLEY et al., 1995). Nas células prostáticas, a testosterona é convertida, pela enzima 5 α -redutase (SRD5A2), em di-hidrotestosterona (DHT), em sua forma mais ativa e com maior afinidade ao receptor de andrógenos (figura 3) (BRINKMANN et al., 1999; MELMED et al., 2016; QUIGLEY et al., 1995).

O receptor de andrógenos (AR) é membro da superfamília de receptores nucleares esteróide-tireóide-retinóide. Sua ativação, à partir da interação com os

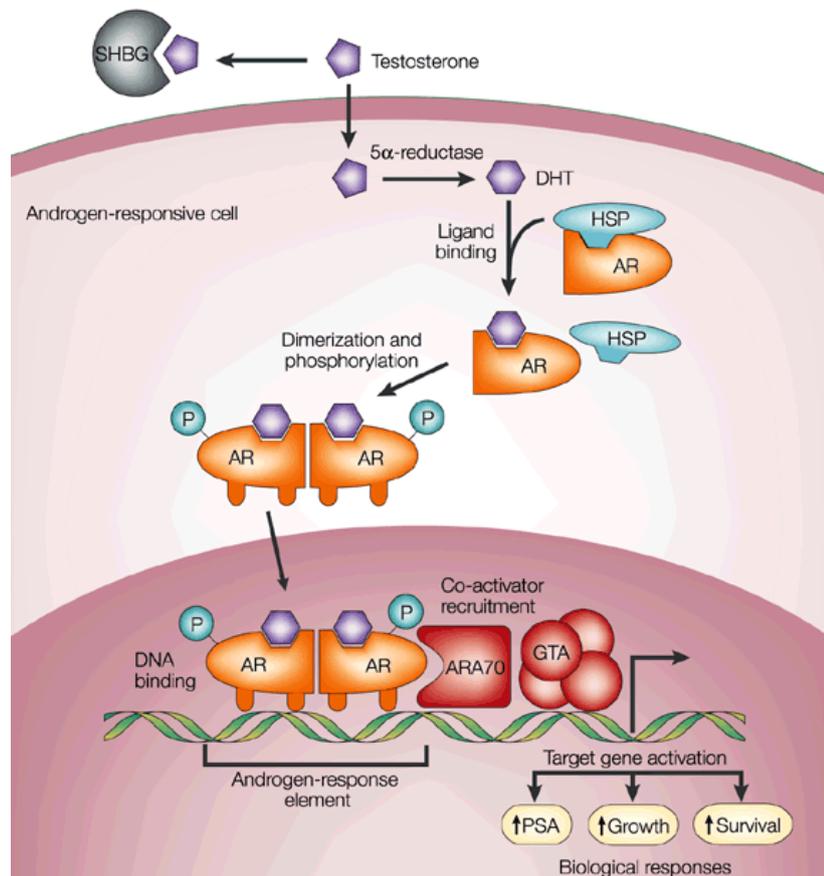


FIGURA 3 - Ação androgênica nas células epiteliais prostáticas - Nas células prostáticas, a testosterona é convertida em di-hidrotestosterona (DHT) pela enzima 5 α -redutase. A ligação da DHT com o receptor de andrógenos (AR) promove a dimerização e fosforilação deste complexo, permitindo sua interação com elementos responsivos aos andrógenos (AREs, do inglês *Androgen-response elements*) nas regiões promotoras dos genes de interesse. Ativação ou repressão destes genes, promoverá respostas biológicas, como crescimento e sobrevivência celular (FELDMAN; FELDMAN, 2001)

hormônios androgênicos promove modificação conformacional no AR, resultando em formação de complexos homo dímeros que interagem com os elementos responsivos aos andrógenos (ARES, do inglês *Androgen Response Elements*) na região promotora dos genes alvo, ativando o aparato transcricional, estimulando ou inibindo transcrição dos genes alvo (figura 3) (HEINLEIN; CHANG, 2002; MCKENNA; LANZ; O'MALLEY, 1999; ROY et al., 1998).

A ação androgênica na próstata, através dos receptores de andrógenos, são importantes para o desenvolvimento e funcionamento prostático (HEINLEIN; CHANG, 2004). Considerando que 80%-90% dos cânceres de próstata são andrógeno-dependentes e a via androgênica é utilizada como abordagem no tratamento do câncer de próstata, os AR e seus moduladores são fatores importantes para o desenvolvimento e progressão desta doença (CULIG, 2019; DENIS; GRIFFITHS, 2000; LANGLEY; NOBES, 2013; SHARIFI, 2005).

Estudos em roedores senis relataram mudanças na sensibilidade prostática a hormônios andrógenos, o que foi atribuído a uma diminuição na expressão de AR e diminuição da atuação da 5 α -redutase nesta glândula. (BANERJEE; BANERJEE; BROWN, 2001; CORDEIRO et al., 2008).

Análises imuno-histoquímicas realizadas no epitélio prostático apresentaram imunoreatividade em células epiteliais luminais, células estromais fibromusculares e nas células endoteliais prostáticas (EL-ALFY et al., 1999; FUJITA; NONOMURA, 2019). A expressão de AR em células basais é relativamente baixa se comparada às células luminais (LEAV et al., 1996), entretanto este tipo celular responde às alterações dos níveis de andrógenos (TAYLOR; RISBRIDGER, 2008).

No epitélio e estroma normais, o AR atua na síntese de proteínas diversas e fatores de crescimento importantes para o crescimento e homeostase do tecido prostático. Dentre eles estão os fatores de crescimento epidérmico e de fibroblastos (EGF e EGF), o semelhante à insulina (IGF-I e II), o transformante *beta*(TGF- β), o derivado de plaqueta (PDGF) e o de queratinócitos (KGF) (CARVALHO-SALLES; TAJARA, 1999; GRIFFITHS; MORTON; NICHOLSON, 1997; MUKHERJEE; MAYER, 2008; ZHU; KYPRIANOU,

2008). Em camundongos nocauteados para expressão de AR em fibroblastos e células de músculo liso, houve diminuição no desenvolvimento da próstata destes camundongos, assim como supressão do desenvolvimento de neoplasia intraepitelial prostática (LAI et al., 2012).

As células luminais basais são andrógeno-independentes, mas andrógeno-responsivas, podendo ser estimuladas por ação androgênica via fatores de crescimento derivados do estroma para a renovação do compartimento celular luminal (TAYLOR; RISBRIDGER, 2008). A expressão de AR em células basais é relativamente baixa se comparada às células luminais (LEAV et al., 1996). Contudo, as células basais expressam focalmente os receptores estrogênicos (ER) e podem proliferar quando submetidas à terapia estrogênica (COLLINS; MAITLAND, 2006).

Segundo Nellesmann *et al.* (2005) a expressão de AR na próstata parece estar sob regulação de estrógenos e andrógenos, já que a co-administração de testosterona com anti-estrógeno ou a co-administração de estrógeno com anti-andrógeno reduziu os efeitos dos hormônios sexuais.

A biossíntese de estrógenos ocorre a partir de um substrato androgênico, a testosterona, através da aromatização desse hormônio pela enzima aromatase (RISBRIDGER et al., 2003). O balanço entre andrógenos e estrógenos, o qual contribui para os níveis circulantes desses hormônios, é crucial para o homeostase prostática, sendo a aromatase uma reguladora crítica desses hormônios (RISBRIDGER et al., 2003).

Na próstata, o estrógeno apresenta efeitos antagônicos: promotor ou supressor de tumores. Essa ação é resultado da existência de dois receptores estrogênicos prostáticos específicos: α e β (ER α , ER β), os quais são predominantemente expressos no estroma e no epitélio, respectivamente (BONKHOFF et al., 1999; CUNHA; MATRISIAN, 2002; LEAV et al., 2001). Na próstata anterior de roedores, o ER α é expresso no epitélio e estroma (RISBRIDGER et al., 2003).

A presença de estrógenos tem se mostrado importante na manutenção do tecido prostático devido ao sinergismo com andrógenos e a identificação desses dois

subtipos de receptores estrogênicos no tecido prostático confirma a sinalização do caminho de estrógenos neste órgão (CUNHA; MATRISIAN, 2002; WEIHUA et al., 2002).

Os efeitos estrogênicos na próstata são complexos e podem envolver ações diretas, através dos receptores, e indiretas, através do eixo hipotálamo-hipófise-gônada e dos níveis de prolactina (CUNHA; MATRISIAN, 2002; HÄRKÖNEN; MÄKELÄ, 2004). Assim, apesar da próstata ser um órgão andrógeno-dependente, o estrógeno influencia na homeostase e alterações patológicas desta glândula (EKMAN, 2000; WEIHUA et al., 2002).

Além dos andrógenos, a atuação dos estrógenos na próstata está relacionada à da prolactina (HÄRKÖNEN, 2003). A prolactina regula a próstata, estimulando sua proliferação, atividade secretora e sobrevivência (NEVALAINEN et al., 1991, 1993; PRINS; BIRCH, 1995; REITER et al., 1999). Atuação excessiva da prolactina induz hipertrofia no epitélio prostático e no compartimento estromal em culturas celulares e em camundongos transgênicos para superexpressão de prolactina (KINDBLOM et al., 2003; NEVALAINEN et al., 1991, 1993; WENNBO et al., 1997).

Os estrógenos aumentam o nível de receptores de prolactina nas células epiteliais prostáticas, tornado possível que a prolactina sinalize os efeitos estrogênicos na próstata não somente de maneira sistêmica, mas também em nível celular, sendo um importante mecanismo no desenvolvimento das mudanças displásicas desse órgão (HÄRKÖNEN; MÄKELÄ, 2004). Assim, há relação entre os níveis de prolactina e o aumento de doenças prostáticas (BARTKE, 2004).

Esse hormônio age como fator de crescimento para o tecido prostático, tendo papel na sobrevivência das células epiteliais depois da castração (INGELMO et al., 2007), e inibe a apoptose induzida pela castração (DAGVADORJ et al., 2007). Também, a prolactina altera a permeabilidade da membrana celular prostática aos andrógenos (JEYARAJ et al., 2000). Segundo Nevalainen *et al.* (1997), a ação autócrina ou parácrina da prolactina na próstata pode mediar algumas ações androgênicas. Assim, a síntese local de prolactina pode ser realizada por fatores que controlam a regulação

androgênica de células cancerosas prostáticas durante o crescimento independente de andrógeno (HETZL *et al.*, 2013).

Hetzl *et al.* (2016) verificaram que em animais idosos submetidos a ablação androgênica e estrogênica, a prolactina poderia ser ativada não só em uma via independente de androgênio, mas também em uma via independente de estrogênio, devido ao aumento da reatividade da prolactina no estroma prostático. Verificou-se também aumento dos níveis de prolactina que pode ter sido sinalizado por fatores de crescimento, o EGF (Fator de crescimento de Epiderme).

1.6. Jabuticaba e suas propriedades

O consumo de produtos naturais tem sido uma escolha consciente, não somente devido seus atributos sensoriais e preferências pessoais, mas na tentativa de manter uma alimentação saudável devido aos nutrientes e compostos bioativos que apresentam (GROSSO *et al.*, 2017; ROOSEN *et al.*, 2007). Além de nutrientes essenciais, a maioria das frutas contém minerais, fibras, vitaminas e compostos fenólicos (LEITE-LEGATTI *et al.*, 2012). Os compostos fenólicos estão presentes na maioria dos tecidos vegetais, incluindo suas partes comestíveis, como em frutas, sementes, folhas e raízes (DE LA ROSA *et al.*, 2019). Este é um amplo grupo de moléculas caracterizados por sua estrutura química, sendo substâncias que possuem ao menos anel benzênico ligado a uma ou mais hidroxilas (DE LA ROSA *et al.*, 2019; HO; RAFI; GHAI, 2010; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; TSIMOGIANNIS; OREOPOULOU, 2019). Os compostos fenólicos podem ser subdivididos de acordo com suas estruturas químicas em duas categorias: flavonóides e não-flavonóides, sendo este último composto por ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, cumarinas, lignanas, quinonas, estiletes e curcuminóides (ABE *et al.*, 2007; DE LA ROSA *et al.*, 2019; HO; RAFI; GHAI, 2010; RISBRIDGER *et al.*, 2003; TSIMOGIANNIS; OREOPOULOU, 2019). Compostos naturais tem sido estudados para uso em terapias, como prevenção de doenças metabólicas e crônicas (GIBELLINI *et al.*, 2015; GULLETT *et al.*, 2010; LAMAS *et al.*, 2018).

As antocianinas pertencem à classe dos flavonóides e são encontradas em abundância chás, vinhos, frutas, cereais, óleos e são responsáveis pela coloração azul

escura e vermelho vivo das flores e frutos. Devido sua ampla gama de efeitos benéficos à saúde, tem sido alvo de estudo nos últimos anos. (BLESSO, 2019; DRAGANO et al., 2013; GULLETT et al., 2010; KALT et al., 2019; KONG et al., 2003; LAMAS et al., 2018; LEITE-LEGATTI et al., 2012). As antocianinas apresentam propriedades farmacológicas, como atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antiobesidade e efeitos preventivos sobre doenças degenerativas (DRAGANO et al., 2013; HE; GIUSTI, 2010; KANG; LEE; LEE, 2019; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; ZAFRA-STONE et al., 2007).

A atuação das antocianinas tem sido estudada na suplementação na dieta ou na forma de extratos e seu consumo promove diminuição da obesidade e síndromes metabólicas em roedores (FORSYTHE; WALLACE; LIVINGSTONE, 2008; KANG; LEE; LEE, 2019; LAMAS et al., 2018; LEITE-LEGATTI et al., 2012). Camundongos C57BL/6 que consumiram antocianinas provenientes de cereja em suas dietas hiperlipídicas apresentaram redução no ganho de peso, na massa de gordura corporal e melhoria na resposta inflamatória. Também, houve melhoria na atividade antioxidante das enzimas superóxido desmutase e glutatona peroxidase (WU et al., 2014). Estudos em camundongos que receberam dieta hiperlipídica e que utilizaram outras fontes de antocianinas, como extrato etanólico de soja preto, antocianinas purificadas de mirtilo, suco de uva e madressilva obtiveram resultados semelhantes. Em alguns casos houve melhora no perfil lipídico plasmático e/ou sensibilidade a insulina glicêmica (KANG; LEE; LEE, 2019).

As antocianinas são encontradas em grande quantidade nas cascas de jabuticaba, fruto de uma árvore frutífera nativa da mata atlântica e de grande ocorrência no Brasil. A Jabuticaba é uma baga globosa com casca avermelhada, quase preta, com polpa esbranquiçada apresentando de uma a quatro sementes (DRAGANO et al., 2013). Pode ser encontrada nas variedades: *Myrciaria caulifolia* Vell Berg e *Myrciaria caulifolia* (DC) Berg (MATTOS, J.R., 1983; DONADIO, L.C., 2000). O fruto da jabuticaba é geralmente consumido fresco, ou na forma de geleias e licores. A casca da jabuticaba é comumente utilizada na medicina popular como tratamento para diarreia, irritação na pele, asma, inflamação dos intestinos e hemoptise (DE LIMA et al., 2008).

A casca da jabuticaba apresenta compostos fenólicos em grande quantidade, dentre eles as antocianinas, quercetina, ácido elágico e ácido gálico (ABE et al., 2007). Estudos mostraram que a adição de 1% e 2% da casca da jabuticaba liofilizada na dieta aumentaram a ação antioxidante de animais saudáveis e ao aumentar esta adição para 4% há a redução do ganho de peso e melhora nos níveis de colesterol HDL (LEITE-LEGATTI et al., 2012; LEITE et al., 2011; LENQUISTE et al., 2015).

Lamas *et al.* (2018) apresentou um extrato da casca da jabuticaba (ECJ) com 19 compostos bioativos em altas concentrações, dentre eles estão as antocianinas, rutina ácido elágico, ácido gálico e ácido ascórbico. O ECJ apresenta altos níveis de compostos fenólicos e capacidade antioxidante em comparação com o encontrado na literatura com a casca da jabuticaba. Quando comparado com a extração metanólica e aquosa da casca da jabuticaba realizada por Lenquiste *et al.* (2015) o ECJ apresenta aumento de 100% dos compostos fenólicos. Em comparação com a extração etanólica de outras frutas, como a uva e a amora, estas apresentaram 42% e 71% dos compostos fenólicos em relação ao ECJ (LAMAS et al., 2018). Os altos níveis de compostos bioativos, como as antocianinas e outros flavonóides presentes neste extrato, permitem o consumo de baixas doses de extrato, controle preciso da dose a ser consumida, sendo uma terapia mais viável do que a suplementação da jabuticaba na ração (LAMAS et al., 2018).

O extrato da casca da jabuticaba possui efeitos dose-dependentes na prevenção da obesidade, pré-diabetes, desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD, do inglês *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*) em camundongos FVB senis que consumiram dieta hiperlipídica. Também, efeitos hepáticos protetivos e recuperação de alterações metabólicas relacionadas com o envelhecimento foram observadas através da redução de glicemia, colesterol total e LDL, acúmulo de lipídios, infiltrados e marcadores inflamatórios (COX-2 e TNF α)(LAMAS et al., 2018).

2. JUSTIFICATIVA

A dinâmica de desenvolvimento e progressão do câncer de próstata ainda não está totalmente esclarecida, dada a complexidade do funcionamento da próstata e também devido ao fato de cada lobo dessa glândula apresentar dependência hormonal distinta, e assim responderem diferencialmente à instalação e evolução dessa doença. O lobo anterior apresenta lento desenvolvimento e progressão do câncer de próstata, apresentando altas taxas de tecido saudável enquanto outros lobos apresentam severas lesões pré-neoplásicas.

Em adição, é conhecido que a ingestão de dietas ricas em gorduras, levando ao sobrepeso, tem efeito prejudicial sobre a próstata, se considerando aumento da proliferação, progressão e metástase do câncer de próstata. Contudo, não está esclarecido quais são as respostas de diferentes fatores sinalizadores no microambiente prostático frente a essa ingestão.

Ainda, estudos recentes têm verificado que a ação de antioxidantes, como os polifenóis de origem natural, tem efeito benéfico na inibição de vias relacionadas ao desenvolvimento das lesões, como o aumento do estresse oxidativo e da inflamação em diferentes órgãos. Dessa forma, diferentes frutas brasileiras, como a Jabuticaba, têm sido estudadas devido suas propriedades antioxidantes.

Desta maneira, o estudo do microambiente prostático e a modulação hormonal no desenvolvimento de câncer, se considerando seus aspectos estruturais e moleculares, em associação ao consumo de dieta rica em lipídios e administração do extrato de Jabuticaba tem importância não só para a determinação do papel do extrato de Jabuticaba no desenvolvimento do câncer de próstata como também em associação a ingestão da dieta hiperlipídica.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo Geral:*

O objetivo geral deste estudo é caracterizar os efeitos do extrato da casca de Jabuticaba sobre a progressão do câncer no lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP associado a dieta hiperlipídica, abordando aspectos estruturais e moleculares.

3.2. *Objetivos específicos:*

Caracterizar no lobo anterior da próstata anterior de camundongos TRAMP em diferentes estágios de lesões, os quais receberam dieta hiperlipídica e foram submetidos ou não à administração do extrato da casca da Jabuticaba:

a) A morfologia do epitélio e do estroma da próstata anterior, além da distribuição do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA);

b) Os receptores hormonais androgênico (AR), estrogênico alfa (ER α) e de prolactina (PR);

c) Os fatores de crescimento relacionados à dinâmica estromal como fator de crescimento transformante (TGF- β) e receptor do fator de crescimento fibroblástico (FGFR), além da α -actina e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais e procedimento experimental

No presente trabalho foram utilizados 50 camundongos machos transgênicos da linhagem TRAMP (C57BL/6-Tg (TRAMP)8247Ng/J X FVB/NJ) F1/J) (figura 4) obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Todos os animais obtidos do CEMIB receberam água e ração *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil) e foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Celular e Estrutural (Área de Anatomia) do Instituto de Biologia até atingirem a idade experimental para cada grupo de tratamento. Os camundongos da linhagem TRAMP foram importados da *The Jackson Laboratory* com posterior instalação e reprodução da colônia no CEMIB/UNICAMP com financiamento da FAPESP (Processos: 18/04579-7 e 15/25714-1).



FIGURA 4 – Modelo experimental TRAMP – Modelo experimental de camundongos machos transgênicos utilizados no estudo de câncer de próstata.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (figura 5):

- Grupo controle (C8): Camundongos TRAMP que receberam água e ração Nuvilab *ad libitum* e foram eutanasiados com 8 semanas de idade (n=10 animais).

- Grupo controle dieta normolipídica (C16): Camundongos TRAMP com 8 semanas de idade que receberam água e ração AIN-93M *ad libitum* (modificada de

Goena *et al.*, (1989); Reeves *et al.*, (1993)). Os animais receberam 5 doses semanais de água, via gavagem e foram eutanasiados com 16 semanas de idade (n=10 animais).

- Grupo jabuticaba dieta normolipídica (JC): Camundongos TRAMP com 8 semanas de idade que receberam água e ração AIN-93M *ad libitum* (modificada de Goena *et al.*, (1989); Reeves *et al.*, (1993)). Os animais receberam 5 doses semanais de extrato da casca da Jabuticaba (ECJ) (5,8g de ECJ/ kg de peso corpóreo) via gavagem e foram eutanasiados com 16 semanas de idade (n=10 animais).

- Grupo controle dieta hiperlipídica (CH): Camundongos TRAMP com 8 semanas de idade que receberam água e dieta hiperlipídica *ad libitum* (modificada de Goena *et al.*, (1989); Reeves *et al.*, (1993)). Os animais receberam 5 doses semanais de água, via gavagem e foram eutanasiados com 16 semanas de idade (n=10 animais).

- Grupo jabuticaba dieta hiperlipídica (JH): Camundongos TRAMP com 8 semanas de idade, receberam água e dieta hiperlipídica *ad libitum* (modificada de Goena *et al.*, (1989); Reeves *et al.*, (1993)). Os animais receberam 5 doses semanais de ECJ (5,8g de ECJ/ kg de peso corpóreo) via gavagem e foram eutanasiados com 16 semanas de idade (n=10 animais).

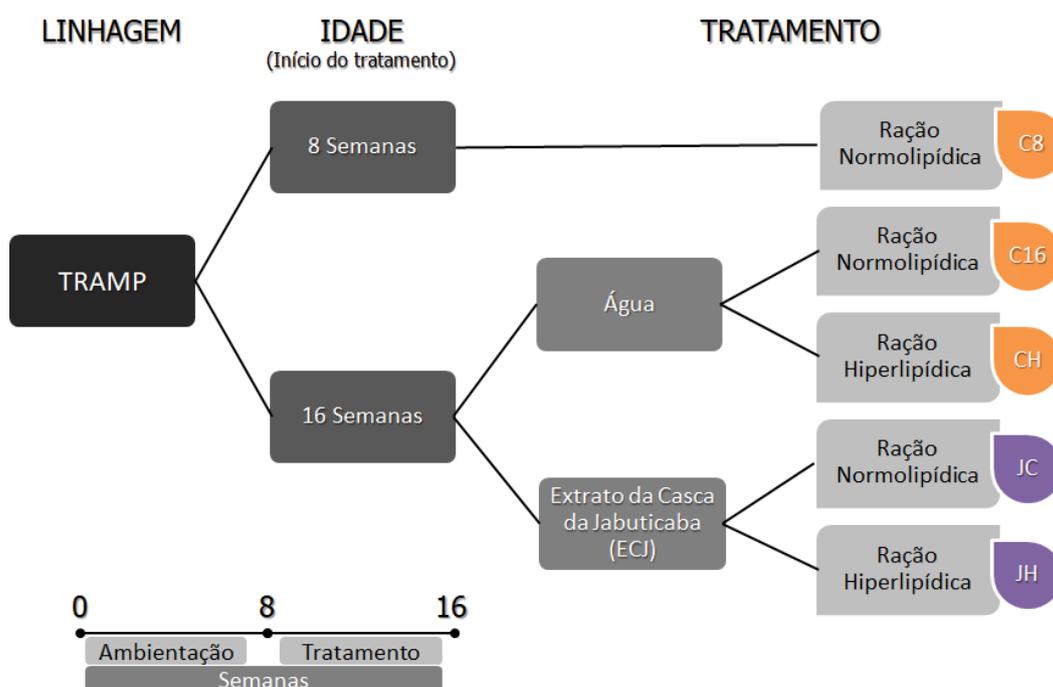


FIGURA 5 – Distribuição esquemática dos diferentes grupos experimentais.

Após os animais atingirem as idades determinadas nos diferentes grupos experimentais, esses foram pesados em balança analítica Denver P-214 (*Denver Instrument Company*, Arvada, CO, EUA) e anestesiados com 2% Xilazina (5 mg/kg i.m.; *König*, São Paulo, Brasil) e Cetamina (60 mg/kg i.m.; *Fort Dodge*, Iowa, EUA). A eutanásia foi realizada por sobredosagem de anestesia após a coleta tecidual.

Amostras do lobo anterior da próstata foram coletadas, identificadas e fixadas em solução fixadora de Bouin *overnight*, após este período os lobos foram seccionados transversalmente e mantidos na solução fixadora até completarem 24h de imersão pós coleta. Após a fixação, os tecidos foram lavados em álcool etílico a 70% até não haver resquícios do fixador, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois durante 30 minutos cada. Os fragmentos foram diafanizados em duas soluções distintas de Xilol P.A. por 1 hora e incluídos em dois banhos distintos de polímeros plásticos (*Paraplast Plus*, *ST. Louis*, MO, EUA), aquecidos previamente em estufa à 60°C, *overnight*. Estas amostras foram submetidas às análises morfológicas de microscopia de luz e imunohistoquímica para as moléculas α -actina, Receptores de Andrógeno (AR) e Estrógeno (ER α), Prolactina, Fator Transformante Beta (TGF- β), Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), Índice Proliferativo (PCNA) (Luz & Zancheta Neto, 2002).

O protocolo experimental está de acordo com as normas vigentes de experimentação animal, conforme protocolo da Comissão de Ética no uso de animais/CEUA/UNICAMP (CEUA:4605-1/2017).

4.2. Preparação das dietas normolipídica e hiperlipídica

As dietas normolipídica e hiperlipídica foram preparadas no laboratório do Prof° Dr° Mário Roberto Maróstica Jr. (FEA-UNICAMP).

A dieta normolipídica foi preparada de acordo com o Instituto Americano de Nutrição (AIN 93M) (REEVES; ROSSOW; LINDLAUF, 1993) com adaptação do conteúdo de proteína em 12% em peso (GOENA et al., 1989) (Tabela 1). A dieta hiperlipídica (HFD) foi produzida a partir da dieta normolipídica (AIN 93M, modificada), adaptada para alto teor de lipídios (35% em peso) (LENQUISTE et al., 2012) (Tabela 1).

Ambas as dietas foram disponibilizadas para consumo dos camundongos dos grupos experimentais por 56 dias. Os grupos controles de 8 e 16 semanas (C8 e C16, respectivamente) e o grupo tratado com Jabuticaba (JC) receberam a dieta normolipídica, já o grupo controle hiperlipídico (CH) e o tratado com Jabuticaba (JH), receberam a dieta hiperlipídica.

Tabela 1 – Composição das dietas normolipídica e hiperlipídica, modificadas da ração AIN 93M.

Ingredientes	Dieta Normolipídica (g/Kg)		Dieta Hiperlipídica (g/Kg)	
		%	%	
Caseína (83,5% de proteína)	143,7	12%	12%	143,7
Amido de Milho	462	46,2%	15,2%	152
Maltodextrina	155	15,5%	15,5%	155
Sacarose	100	10%	10%	100
Fibra (Celulose)	50	5%	5%	50
Óleo de Soja	40	4%	4%	40
Gordura Animal	-	0,0%	31%	310
Mistura Mineral (AIN 93M)	35	3,5%	3,5%	35
Mistura de Vitaminas (AIN 93M)	10	1%	1%	10
L-Cisteína	1,8	0,18%	0,18%	1,8
Bitartarato de Colina	2,5	0,25%	0,25%	2,5
Terc-butilhidroquinona	0,008	0,0008%	0,0008%	0,008
Total (g)	1000			1000
Densidade Energética (Kcal/g)	3,8			5,35

4.3. Preparação do extrato da casca de jabuticaba (ECJ).

A extração é um processo usado para isolar compostos bioativos de produtos naturais. Uma extração eficiente deve maximizar a recuperação dos compostos, com baixa toxicidade. O método utilizado para preparar o extrato da casca da Jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) constituiu na solubilização da casca da Jabuticaba liofilizada em etanol com posterior remoção do solvente. Os compostos do ECJ e sua atividade antioxidante in vitro foram avaliados conforme descrito em Maróstica *et al.* (2017).

4.3.1. Avaliação da composição do extrato da casca da Jabuticaba.

A caracterização detalhada da natureza e composição dos compostos bioativos do extrato da casca da jabuticaba utilizado neste estudo foi realizada por Lama et al (2018). Entretanto, após todas as preparações do mesmo, a avaliação dos compostos bioativos do ECJ foi realizada, antecedendo a administração para os animais dos grupos experimentais para padronização da dosagem exata a ser administrada (tabela 2).

Tabela 2 – Média das análises dos componentes bioativos do extrato da casca da Jabuticaba.

Polifenóis	Extrato (mg/mL)
Fenólicos	12,36 ± 1,79 (<i>ác. gálico</i>)
Flavonóides	2,05 ± 0,24 (<i>catequina</i>)
Antocianinas monoméricas	0,96 ± 0,11 (<i>cya 3-glu</i>)

4.4. Avaliação do ganho de peso dos animais e consumo energético

Para avaliar o ganho de peso dos animais experimentais, a diferença entre os pesos inicial e final destes foi considerada. Além disto, o controle do consumo de ração foi realizado, de acordo com a massa de ração distribuída aos animais no início e no final da mesma semana. A fim de avaliar o consumo energético, a massa de ração consumida foi multiplicada pelo valor energético de cada ração (estes valores podem ser encontrados na Tabela 1). Para estas análises, as pesagens dos animais e da ração foram realizadas no período das 14:00h às 16:00 horas. Essa parte do projeto foi realizada em conjunto com a aluna de doutorado Ms^a Ellen Nogueira Lima publicado sobre o título “*High-fat diet effects on the prostatic adenocarcinoma model and jaboticaba peel extract intake: Protective response in metabolic disorders and liver histopathology*”, cujo os animais serão os mesmos utilizados nesse projeto de mestrado.

4.5. Análise morfológica e morfométrica através de microscopia de luz

Amostras do lobo anterior da próstata de 5 animais de cada grupo foram seccionados no micrótomo Hyrax M60 (Zeiss, Munique, Alemanha) com espessura de

5µm em lâminas não silanizadas e corados em Hematoxilina-Eosina (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979).

A análise morfológica do lobo anterior prostático foi realizada utilizando-se fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400 - Nikon, Tokyo, Japão) e o *software Nis-Elements: Advanced Research (USA)*, analisando-se 10 campos aleatórios sem sobreposição com lente objetiva de 40X e divididos em 04 quadrantes (figura 6.A). As lesões presentes em cada quadrante foram classificadas numericamente de 0 a 3, de acordo com a Tabela 3 (KIDO et al., 2016, modificado de Berman-Booty *et al.*, (2012)). Posteriormente, a somatória de pontos por lesão e o cálculo da frequência relativa da respectiva lesão foi realizada em cada animal ($\sum \text{Pontos de lesões} / \sum \text{Pontos Totais}$) (figura 6.B).

Tabela 3 – Classificação morfológica das lesões prostáticas presentes no lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP.

Tipo de Lesão	Pontuação
Sem lesão	0
PIN de Baixo Grau (LGPIN)	1
PIN de Alto Grau (HGPIN)	2
Adenocarcinoma Bem Diferenciado (WDA)	3

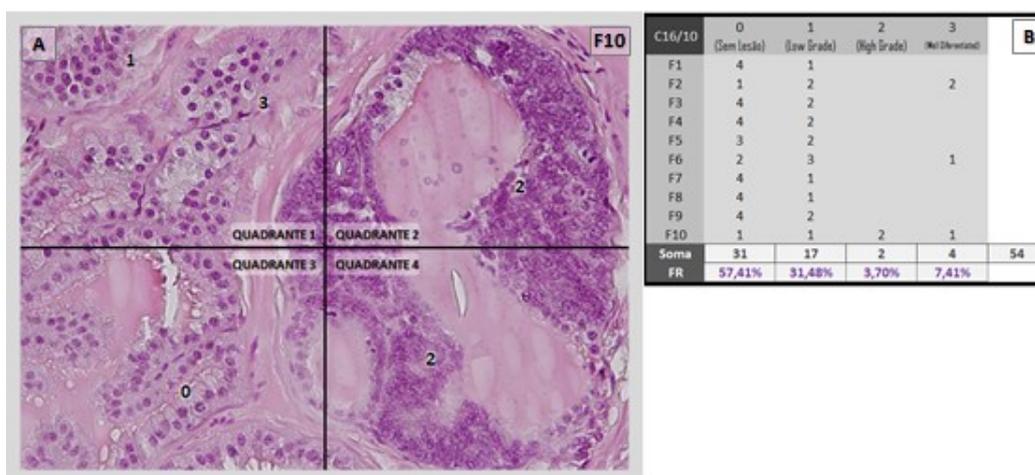


Figura 6 – A) Análise morfológica do lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP. Fotomicrografia dividida em quatro quadrantes, onde o tecido epitelial foi caracterizado, sendo: (0) tecido epitelial saudável, (1) lesão intraepitelial de baixo grau (LGPIN), (2) lesão intraepitelial de alto grau (HGPIN), (3) adenocarcinoma bem diferenciado; **B) Análise morfométrica do lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP.** Cálculo da frequência relativa por lesão por animal.

4.6. **Imunomarcção de α -actina, ER α , FGFR-3 e PCNA.**

Amostras do lobo anterior da próstata de 5 animais de cada grupo foram seccionados no micrótomo Hyrax M60 (Zeiss, Munique, Alemanha) com espessura de 5 μ m em lâminas sinalizadas e submetidas a análise de imunohistoquímica. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C em microondas (potência de 750 W) por 10-15 minutos. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com 0,3%-0,5% peróxido de hidrogênio (H₂O₂) diluído em metanol P.A. por 20 minutos com posterior incubação para bloqueio de proteínas específicas em 3% - 7% de solução bloqueadora com Albumina Soro Bovino (BSA) diluído em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, o antígeno de interesse foi localizado através de incubação com anticorpo específico (tabela 4) diluído em BSA 1%, *overnight* à 4°C. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário HRP (tabela 4) conjugado diluído em BSA 1% por 2 horas. Estes cortes foram revelados com diaminobenzidina (DAB). Para a contra-coloração, Hematoxilina de Harris foi utilizada. As lâminas foram desidratadas em uma série crescente de álcoois, diafanizadas em duas soluções distintas de Xilol P.A. e montadas com Entellan® (Merck). Os cortes prostáticos foram avaliados através do precipitado acastanhado de DAB, o qual indicou a imunoreatividade do antígeno. As diluições dos anticorpos utilizados na localização dos antígenos encontram-se na Tabela 4.

A análise da imunomarcção positiva foi avaliada utilizando-se fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400 - Nikon, Tokyo, Japão) e o *software Nis-Elements: Advanced Research* (USA) para obtenção de 10 campos aleatórios utilizando-se lente objetiva de 40X. Posteriormente, retículo de 910 intersecções foi utilizado em cada campo, através do programa *Image Pro Plus*, totalizando 9100 intersecções por animal (Lamas et al, 2018, modificado). A quantificação foi realizada através da somatória de intersecções do retículo imunomarcados, correspondentes a Imunoreatividade, dividido pela somatória de intersecções do animal ($\sum \text{Pontos imunomarcados} / \sum \text{Pontos Totais}$).

		ANTÍGENO IMUNOHISTOQUÍMICA			
		ER- α	FGFR3	PCNA	α -Actina
Anticorpo Primário		Santa-Cruz (<i>Rabbit</i>) sc-542	Santa-Cruz (<i>Rabbit</i>) sc-123	ABCAM (<i>Mouse</i>) ab29	ABCAM (<i>Mouse</i>) ab7817
Diluição		1:50	1:50	1:300	1:100
Anticorpo Secundário		Millipore (<i>Anti-Rabbit</i>) AP342P	Millipore (<i>Anti-Rabbit</i>) AP342P	Kit Envision (<i>Anti-Mouse</i>) Dako	Millipore (<i>Anti-Mouse</i>) AP124P
Diluição		1:150	1:100	-	1:300

Tabela 4 – Anticorpos e diluições utilizados na localização dos antígenos para ER α , FGFR3, PCNA, α -Actina através da técnica de imuno-histoquímica no lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP.

4.7. Extração de Proteínas e Western Blotting

Amostras do lobo anterior da próstata foram coletadas de 5 animais de cada grupo experimental, pré-congeladas com Hexano, identificadas e armazenadas em criotubos em biofreezer (-80°C) até sua utilização. Para a extração de proteínas totais as amostras foram pesadas em balança analítica (*Denver Instrument P-603D*) e o tampão de lise (100mM Tris, 10mM EDTA, 100mM Fluoreto de Sódio, 10mM Pirofosfato de Sódio, 10mM Ortovanadato de Potássio, 2mM PMSF, 0,1mg/mL Aprotinina, 1% Triton X-100) foi adicionado na proporção de 30 vezes maior que a massa da amostra e armazenadas no gelo. A homogeneização das amostras foi realizada de forma mecânica com o Polytron (KINEMATICA PT1600 E) em 3 ciclos de 30 segundos a 30.000 RPM cada ou até que não houvesse partículas sólidas no homogenato. Estas amostras foram mantidas no gelo sob agitação leve na mesa agitadora oscilante (*TECNAL TE-143*) por 1 hora para a atuação do tampão de lise. Em seguida as amostras foram submetidas a centrifugação (*Hettich Micro 200R*) por 20 minutos a 14.000 RPM, o sobrenadante foi alíquotado, identificado e armazenado em freezer a -20°C até sua utilização.

A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada através do ensaio de Bradford (*BioRad Protein Assay Solution #5000006*). Uma alíquota de cada amostra do lobo anterior da próstata extraída foi diluída (1:30) em água destilada e adicionada em triplicata em uma microplaca de 96 poços, juntamente com a curva padronizada de soro albumina bovina (BSA). O reagente de Bradford foi diluído (1:4) em água destilada e 200 microlitros foram adicionados em cada poço. A leitura da microplaca foi realizada com ondas de 595nm pelo Synergy (*Biotek H1*). O valor de concentração de proteínas

totais de cada amostra foi obtido substituindo os valores médios de absorvância das amostras na equação de ajuste linear e multiplicando pelo fator de diluição das amostras.

O fracionamento de proteínas foi realizado através da eletroforese em gel de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE), composto por dois géis: Stacking [49% Tampão - 50mM Tris, 4mM EDTA e 2% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate); 4,4% Acrilamida, 37% água, 2,4% TEMED, 2,4% APS (Persulfato de Amônio)] e o Resolving [58% Tampão - 750mM Tris, 4mM EDTA e 2% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate); 8 a 15% Acrilamida, 24% a 3% água, 1,8% TEMED, 0,16% APS (Persulfato de Amônio)]. A polimerização dos géis foi realizada no cassete de 1,5mm de espessura formado pelas placas de vidro pequena e espaçadora (*Biorad Mini-Protean™ Spacer Plates #1653312* e *Short Plates #1653308*). O correspondente a 50 microgramas de proteínas por amostra foi mesclado (1:1) com tampão de Laemmli 3X (100mM Tris-HCl pH 6.8; 10% β-mercaptoetanol, 4% SDS e 20% glicerol), incubadas em banho seco a 100°C por 5 minutos e aplicado em seus respectivos poços no gel Stacking. Os géis foram colocados na cubeta de eletroforese (*Biorad Mini-Protean™ Tetra Vertical Electrophoresis Cell*) juntamente com o Tampão de corrida (7,4% Tris, 0,3% EDTA, 0,4% SDS e 11,4% Glicina) e submetidos a uma corrente elétrica de 30V por 30 minutos e posteriormente a 100V até o final da eletroforese (*Biorad Power™ Pac Basic*).

Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente (*Biorad Mini Trans-Blot® cell*) para membranas de nitrocelulose de 0,45 micrômetros de espessura (*Biorad #1620115*) a 120 V por 90 minutos a 4°C submersas em tampão de transferência (0,3% Tris, 0,02% SDS, 1,44% Glicina e 20% de metanol). As membranas foram bloqueadas com BSA diluído em TBS-T por uma hora e incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários de interesse diluídos em BSA 1% (tabela 5). No dia seguinte, após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários HRP conjugados diluídos em BSA 1% (tabela 5). Após nova série de lavagens com TBS-T, o nível proteico foi detectado por captura (*Syngene GeneGnome5*) de quimioluminescência (*Thermo Scientific™ SuperSignal™*).

A quantificação do nível proteico em cada amostra foi realizada por densitometria através do programa de análise de imagens *ImageJ* (NIH). A β -actina foi utilizada como controle endógeno.

Tabela 5 – Anticorpos e diluições utilizados na localização dos antígenos para AR, ER α , Prolactina, TGF- β , VEGF, α -Actina e β -Actina através da técnica de Western Blotting no lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP.

		ANTÍGENO WESTERN BLOTTING						
		AR	ER- α	Prolactina	TGF- β	VEGF	α -Actina	β -Actina
Anticorpo Primário	Santa Cruz (Mouse) sc-7305	Santa Cruz (Mouse) sc-71064	Santa Cruz (Goat) sc-7805	Santa Cruz (Rabbit) sc-146	Santa Cruz (Mouse) sc-53462	ABCAM (Rabbit) ab5694	Santa Cruz (Mouse) sc-81178	
	Diluição	1:350	1:350	1:350	1:1000	1:250	1:1000	1:500
Anticorpo Secundário	Promega (Anti-Mouse) W402B	Promega (Anti-Rabbit) W401B	Santa Cruz (Anti-Goat) sc-3851	Promega (Anti-Rabbit) W401B	Promega (Anti-Mouse) W402B	Promega (Anti-Rabbit) W401B	Promega (Anti-Mouse) W402B	
	Diluição	1:3000	1:5000	1:3000	1:6000	1:5000	1:6000	1:5000

4.8. Análise Estatística

Os parâmetros quantificados nas análises de morfologia, imuno-histoquímica e Western Blotting foram analisados estatisticamente para os diferentes grupos experimentais. O grupo controle de 8 semanas de idade foi utilizado como parâmetro de confirmação da progressão do adenocarcinoma de próstata, desta maneira foi aplicado *Test-t* para os grupos controle de 8 e 16 semanas (C8 e C16, respectivamente) (ZAR; IRAVANI; LUHESHI, 1990). Análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de intervalo múltiplo de *Tukey* foi aplicado para os grupos controle (C16 e CH) e tratados (JC e JH) (ZAR; IRAVANI; LUHESHI, 1990; MONTGOMERY, D.C., 1991).

As análises foram realizadas através do software *GraphPad Prism* (versão 5.0) com nível de significância de 5% e os resultados foram apresentados como percentual médio \pm desvio padrão. A porcentagem comparativa de aumento ou diminuição de lesões, imunoreatividade e nível proteico entre os grupos experimentais se deu através da

divisão entre a média do grupo de interesse e seu respectivo grupo controle, subtraindo-se 1.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA DE LUZ

As análises morfológicas no grupo C8 demonstraram predominância de tecido glandular saudável no lobo anterior da próstata, sendo esta incidência de 64,4% (Gráfico 1.1A). A progressão da idade promoveu redução de 20% ($p < 0,01$) de tecido epitelial saudável, se comparado ao grupo controle de 16 semanas de idade (C16), indicando a progressão de lesões intraepiteliais pré-neoplásicas conforme o avanço da idade (gráfico 1.1A). O grupo controle de 8 semanas de idade é um parâmetro utilizado no presente estudo para confirmação da progressão das lesões pré-neoplásicas com o avanço da idade, sendo comparável apenas com o grupo controle de 16 semanas de idade (C16), não estando presente na análise estatística entre os grupos tratados.

O tecido glandular do lobo anterior da próstata saudável é composto por ácinos revestidos por células colunares secretoras, com núcleo de localização predominantemente central e nucléolo evidente, entremeadas por células basais de forma piramidal, dispostas de forma descontínua. Os ácinos glandulares do lobo anterior da próstata foram caracterizados pela presença de pregueamento da mucosa glandular, apresentando epitélio secretor projetando-se em direção ao lúmen glandular. Circundando estes ácinos, encontra-se delgado estroma prostático, com a presença de fibras colágenas, células musculares lisas, fibroblastos, além de vasos sanguíneos na periferia da glândula (Figura 6A).

LGPIN foi a lesão predominante nos camundongos deste grupo, quando comparada as demais alterações identificadas, representando 30,4%, caracterizada pela estratificação de células epiteliais prostáticas, apresentando duas ou mais fileiras de células (Gráfico 1.2A e Figuras 6B e 6D). A HGPIN apresentou proliferação e aglomeração de células epiteliais com núcleo aparentemente aumentado em relação ao citoplasma, além de projeção papilar das células hiperplásicas em direção ao lúmen com

conformação cribriforme, sem a presença de estroma entre as fileiras de células epiteliais, representando incidência de 2,8% (Gráfico 1.3A e Figura 6C).

Além disso, focos de adenocarcinoma bem diferenciado foram encontrados, os quais se caracterizaram pela descontinuidade da membrana basal e pela invasão de células epiteliais em direção ao estroma prostático, sendo sua incidência de 2,4% (Gráfico 1.4A e Figura 6C). Também, alterações não pronunciadas no estroma associado a ambas lesões foram observadas como aumento aparente no número de fibroblastos e, conseqüentemente, de fibras colágenas.

As análises morfológicas no grupo controle/16 semanas de idade (C16) apontaram incidência de 52% de tecido glandular saudável no lobo anterior da próstata (figura 7C e 7D), sendo, portanto, 20% ($p < 0,01$) menor em relação aos animais de 8 semanas (gráfico 1.1A).

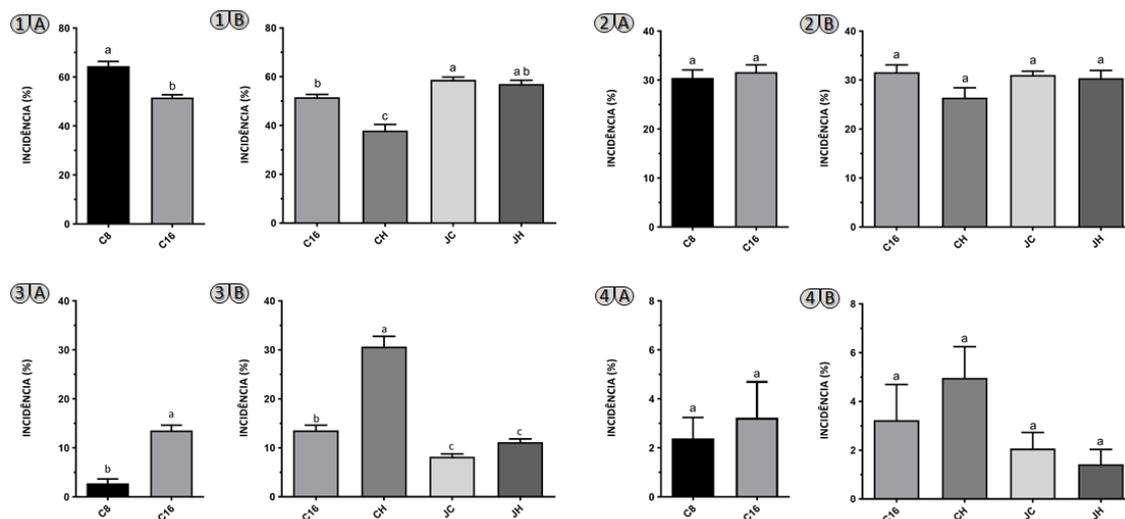


GRÁFICO 1 – Incidência de diferentes lesões morfológicas pré-neoplásicas e neoplásicas em camundongos TRAMP. Percentual de área tecidual (1) sem lesão, (2) com lesão prostática de baixo grau (LGPIN), (3) lesão prostática de alto grau (HGPIN) e (4) adenocarcinoma bem diferenciado (WDA). (A) t-test; (B) ANOVA e Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais e seus respectivos grupos controle (Nível de significância: $p < 0,05$).

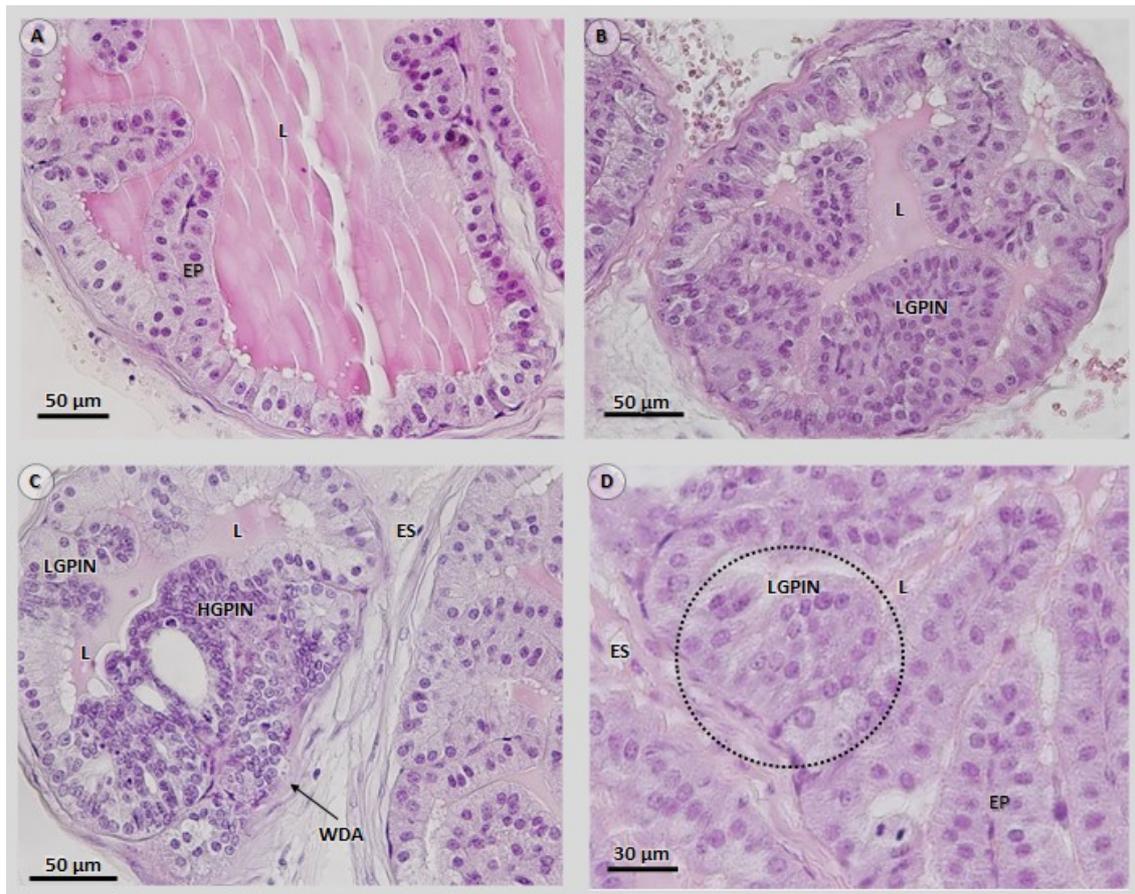


FIGURA 6 – Fotomicrografias do lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP de 8 semanas de idade (C8). **A**) Tecido glandular saudável. Presença de epitélio secretor simples e mucosa pregueada com células colunares de núcleo central (EP); lúmen contendo secreção glandular (L); estroma localizado entre os ácinos e o epitélio pregueado (ES); **B**) estratificação de células epiteliais, característica da lesão intraepitelial prostática (PIN) de baixo grau (LGPIN); **C**) projeções papilares de conformação cribriforme características da lesão intraepitelial prostática (PIN) de alto grau (HGPN) e descontinuidade da membrana basal, além da ocorrência de células epiteliais no estroma, caracterizando do adenocarcinoma bem diferenciado (WDA). Presença de células hipertrofiadas, com perda da polaridade celular caracterizada pela presença de núcleo basal no ácino alterado; **D**) NIP de baixo grau em maior aumento (LGPIN). Coloração: Hematoxilina e Eosina. (Aumento de 40X).

Com relações às lesões apresentadas, predominância de NIP de baixo grau foi verificada neste grupo, representando 31,5% do tecido analisado (gráfico 1.2B e figura 7C). Ainda, focos de NIP de alto grau (gráfico 1.3B e figura 7A e 7D) e adenocarcinoma bem diferenciado (gráfico 1.4B e figura 7B) foram encontrados, sendo a incidência de 13,5% e 3%, respectivamente. Quanto ao estroma glandular, hipertrofia foi identificada com espessamento de fibras colágenas, além de aumento aparente no número de fibroblastos (figura 7B). Tal hipertrofia foi identificada, particularmente, em regiões próximas às lesões epiteliais.

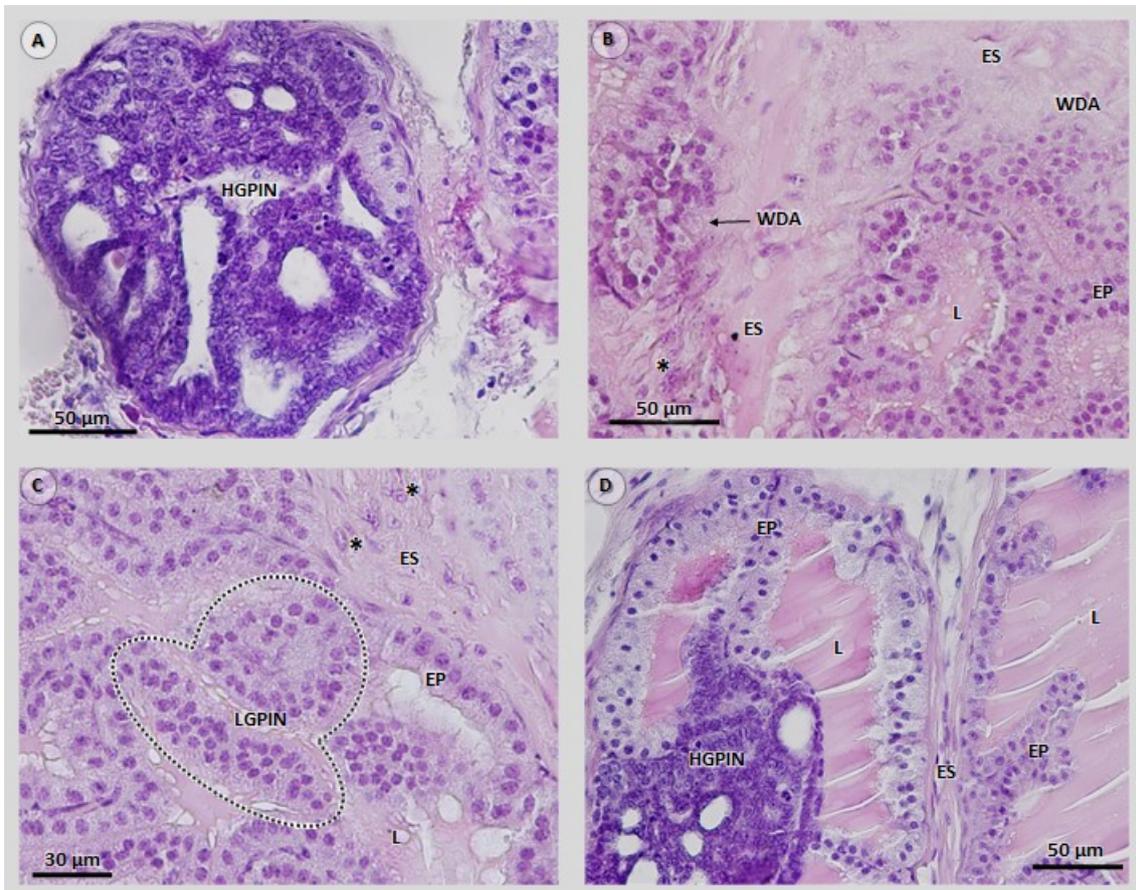


FIGURA 7 – Fotomicrografias do lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP de 16 semanas de idade (C16). **A**) Projeções papilares de conformação cribriforme, características da lesão intraepitelial prostática (PIN) de alto grau (HGPIN) ocupando o lúmen acinar; **B**) descontinuidade da membrana basal, além da ocorrência de células epiteliais no estroma (*), característico do adenocarcinoma bem diferenciado (WDA), presença do epitélio secretor simples e pregueado da mucosa com células colunares de núcleo central (EP), lúmen contendo as secreções do epitélio (L), estroma hipertrofiado localizado entre os ácinos e o epitélio pregueado (ES); **C**) estratificação de células epiteliais, caracterizando intraepitelial prostática (PIN) de baixo grau (LGPIN); **D**) epitélio secretor simples e pregueado da mucosa com células colunares de núcleo central (EP) e projeções papilares de conformação cribriforme características da lesão intraepitelial prostática (PIN) de alto grau (HGPIN) ocupando o lúmen acinar. Coloração: Hematoxilina e Eosina. (Aumento de 40X).

As análises morfológicas no grupo controle hiperlipídico/16 semanas de idade (CH) demonstraram incidência de 38% do tecido glandular saudável no lobo anterior da próstata (gráfico 1.1A). Ainda, eventuais áreas de atrofia foram encontradas no epitélio saudável, caracterizado pela presença de células cúbicas e epitélio não pregueado (figuras 8A e 8E).

Com relações às lesões apresentadas, predominância de NIP de alto grau foi verificada neste grupo, representando 31,6% do tecido analisado (gráfico 1.3B; figuras 7A, 7D e 7F). Ainda, focos de NIP de baixo grau (figura 8B) e adenocarcinoma bem diferenciado (figuras 8B e 8E) foram encontrados, sendo a incidência de 26% e 5%, respectivamente (gráficos 1.2B e 1.4B).

Comparando a incidência de lesões encontradas neste grupo com o grupo C16, aumento significativo de 126% ($p < 0,01$) foi verificado para a lesão NIP de alto grau, e embora não significativo aumento de 54% foi verificado para o adenocarcinoma bem diferenciado. O estroma prostático apresentou-se hipertrófico e hiperplásico, sendo observado aumento aparente do número de fibroblastos e componentes estromais, como fibras colágenas e musculares próximo das áreas lesionadas.

As análises morfológicas no grupo tratado com Jabuticaba/16 semanas de idade demonstraram incidência de 59% do tecido glandular saudável no lobo anterior da próstata (gráfico 1.1B; figura 9C, 9D e 9F). Áreas de hipertrofia estromal foram verificadas nas regiões ao redor do epitélio saudável, caracterizado por aparente aumento dos componentes estromais, como fibras musculares, colágenas e fibroblastos (figuras 9A, 9B, 9C).

Com relações às lesões apresentadas, predominância de NIP de baixo grau foi verificada neste grupo, representando 31% do tecido analisado (gráfico 1.2B). Ainda, focos de NIP de alto grau e adenocarcinoma bem diferenciado foram encontrados, sendo a incidência de 8% e 2%, respectivamente (gráfico 1.3B e 1.4B; figura 9E).

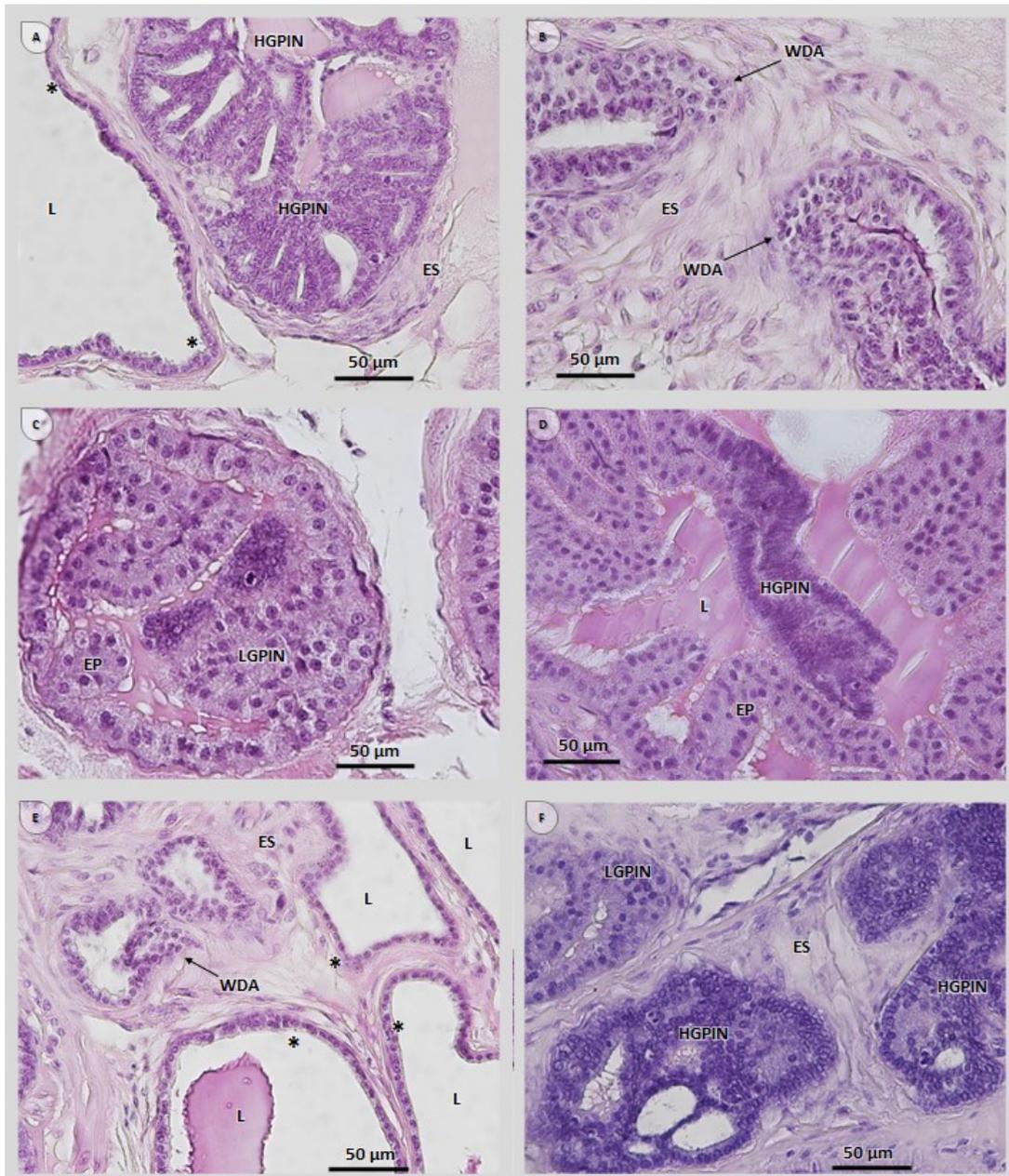


FIGURA 8 – Fotomicrografias do lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP de 16 semanas de idade tratados com dieta hiperlipídica (CH). **A**) Epitélio secretor simples atrofiado (*) e projeções papilares de conformação cribriforme características da lesão intraepitelial prostática (PIN) de alto grau (HGPIN), ocupando o lúmen acinar; **B**) descontinuidade da membrana basal, característico do adenocarcinoma bem diferenciado (WDA); **C**) presença o epitélio secretor simples e mucosa pregueada com células colunares de núcleo central (EP) e estratificação celular característica da lesão intraepitelial prostática (PIN) de baixo grau (LGPIN); **D**) projeções papilares características da lesão intraepitelial prostática (PIN) de alto grau (HGPIN) ocupando o lúmen acinar (L); **E**) descontinuidade da membrana basal e extravasamento de células epiteliais no estroma, característico do adenocarcinoma bem diferenciado (WDA), estroma localizado entre os ácinos (ES), lúmen contendo as secreções do epitélio (L) e o epitélio secretor simples atrofiado (*); **F**) estratificação celular característica da lesão intraepitelial prostática (PIN) de baixo grau (LGPIN), projeções papilares de conformação cribriforme características da lesão intraepitelial prostática (PIN) de alto grau (HGPIN) ocupando o lúmen acinar e o estroma localizado entre os ácinos (ES). Coloração: Hematoxilina e Eosina. (Aumento de 40X).

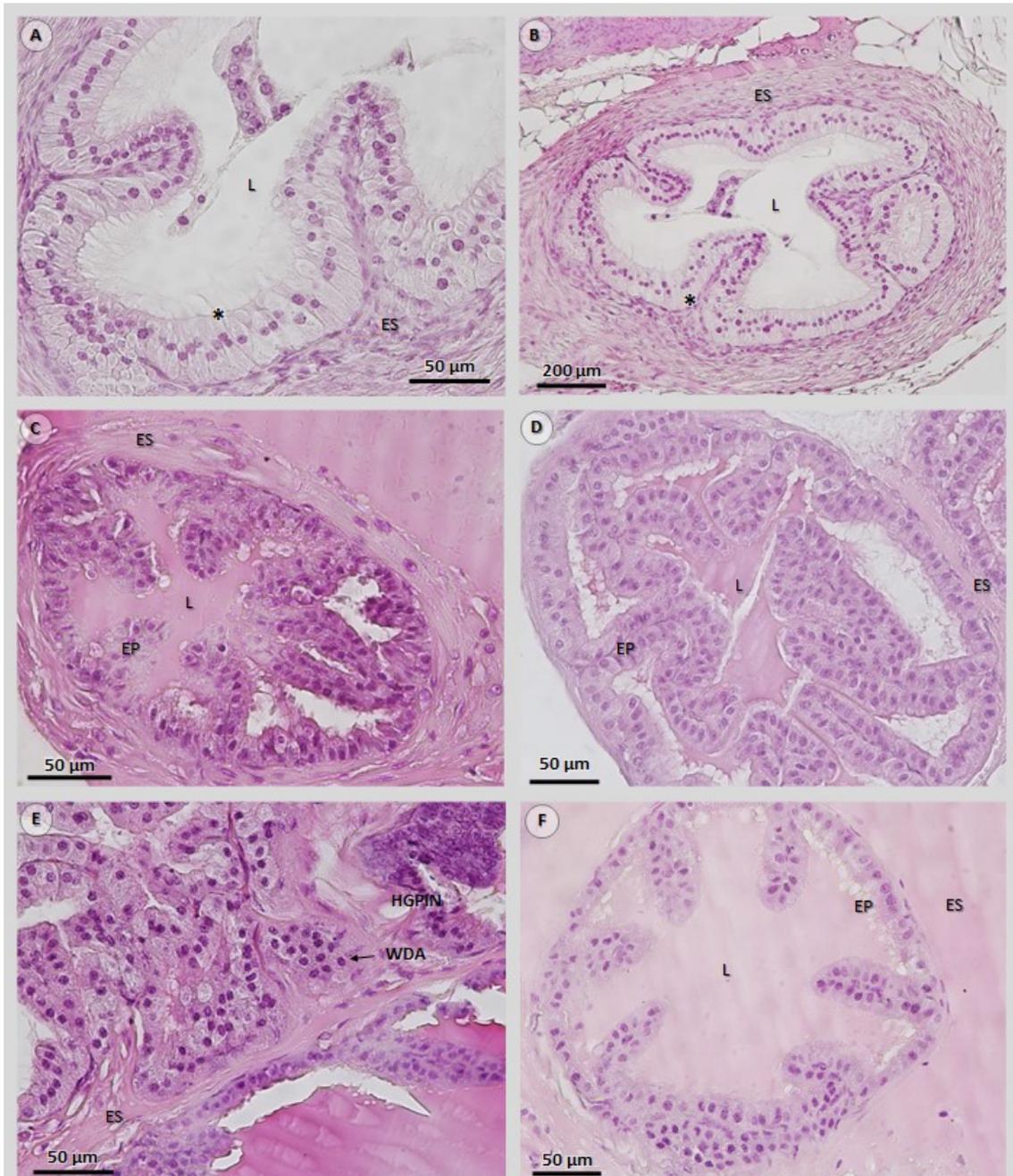


FIGURA 9 – Fotomicrografias lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP de 16 semanas de idade tratados com extrato de jaboticaba (JC). **A)** Hipertrofia do epitélio secretor simples e mucosa pregueada com células colunares de núcleo central (*), lúmen contendo as secreções do epitélio (L) e estroma hipertrofiado localizado entre os ácidos (ES); **B)** hipertrofia do estroma (ES); **C)** presença de epitélio secretor simples e mucosa pregueada com células colunares de núcleo central (EP) e estroma hipertrofiado localizado em torno dos ácidos (ES); **D)** presença de epitélio secretor simples e mucosa pregueada com células colunares de núcleo central (EP), lúmen contendo secreções (L) e estroma localizado em torno dos ácidos (ES); **E)** descontinuidade da membrana basal e extravasamento de células epiteliais no estroma, característico do adenocarcinoma bem diferenciado (WDA), proliferação celular característica da lesão intraepitelial prostática (PIN) de alto grau (HGPIN); **F)** presença o epitélio secretor simples e mucosa pregueada com células colunares de núcleo central (EP), lúmen contendo as secreções do epitélio (L) e estroma localizado em torno dos ácidos (ES). Coloração: Hematoxilina e Eosina. (Aumento de 40X).

Comparando a incidência de lesões encontradas neste grupo com o grupo controle de 16 semanas (C16), diminuição significativa de 40% ($p < 0,01$) foi verificada para a lesão NIP de alto grau, associado à diminuição da incidência de adenocarcinoma bem diferenciado, não significativa.

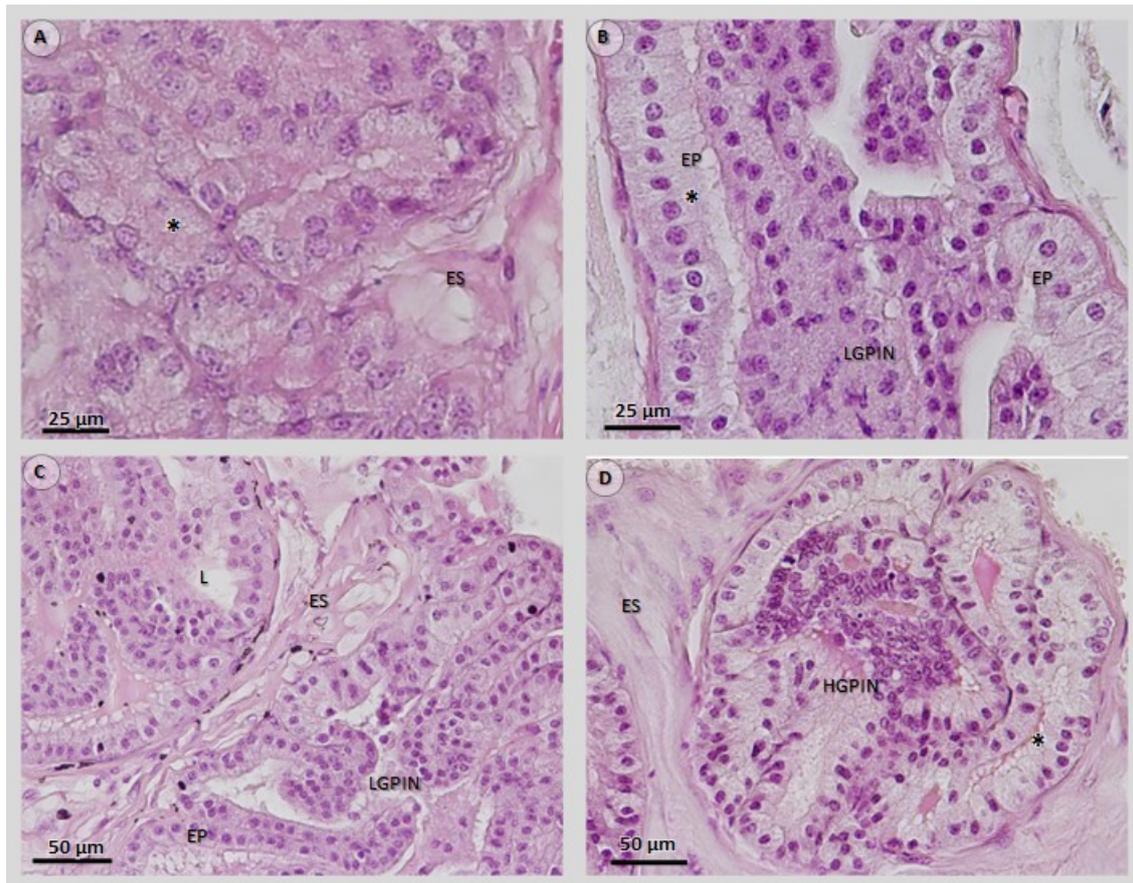


FIGURA 9 – Fotomicrografias do lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP de 16 semanas de idade tratados com dieta hiperlipídica e extrato de Jaboticaba (JH). **A)** Presença de epitélio secretor simples hipertrofiado (*); **B)** epitélio secretor simples e mucosa pregueada com células colunares de núcleo central (EP), estratificação celular característica da lesão intraepitelial prostática (PIN) de baixo grau (LGPIN); **C)** epitélio secretor simples e mucosa pregueada com células colunares de núcleo central (EP), estratificação celular característica da lesão intraepitelial prostática (PIN) de baixo grau (LGPIN) e estroma localizado entre os ácinos (ES); **D)** proliferação celular característica da lesão intraepitelial prostática (PIN) de alto grau (HGPIN), ocupando o lúmen acinar e o estroma localizado entre os ácinos (ES). Coloração: Hematoxilina e Eosina. (Aumento de 40X).

As análises morfológicas no grupo tratado com Jabuticaba e a dieta hiperlipídica/16 semanas de idade demonstraram incidência de 57% do tecido glandular saudável no lobo anterior da próstata (gráfico 1.1B; figura 10A e 10B). Áreas de hipertrofia estromal foram encontradas ao redor de mucosa revestida por epitélio saudável (figura 10A e 10D).

Com relações às lesões apresentadas, predominância de NIP de baixo grau foi verificada neste grupo, representando 30,4% do tecido analisado (gráfico 1.2B; figura 9B e 10C). Ainda, focos de NIP de alto grau e adenocarcinoma bem diferenciado (figura 10D) foram encontrados, sendo a incidência de 11,2% e 1,4%, respectivamente (gráfico 1.3B e 1.4B).

Comparando a incidência de lesões encontradas neste grupo com o grupo controle hiperlipídico de 16 semanas (CH), diminuição de 64% ($p < 0,01$) foi identificada para as lesões NIP de alto grau.

5.2. IMUNOHISTOQUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO PROTEICA PARA α -ACTINA, RECEPTOR DE ANDRÓGENO (AR) E ESTRÓGENO ($ER\alpha$), PROLACTINA, FATOR TRANSFORMANTE BETA ($TGF-\beta$), FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF), ÍNDICE PROLIFERATIVO (PCNA) NOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

5.2.1. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE PROLIFERATIVO ATRAVÉS DA IMUNOMARCAÇÃO DE PCNA

Imunomarcção positiva para determinação da proliferação celular foi observada no núcleo de células epiteliais (figura 11). Nos grupos C8 e C16, imunomarcção nuclear foi verificada nos focos isolados de proliferação no epitélio com frequência relativa de 3% e 5%, respectivamente, caracterizando aumento de 38% conforme avanço da idade (gráfico 2.A).

O consumo da HFD promoveu aumento significativo de 140% ($p<0,01$) da proliferação celular no epitélio em relação ao grupo C16, com frequência relativa de 12,2% (gráfico 2.B). No grupo JH, a imunoreatividade de PCNA tem prevalência em ácinos com lesões epiteliais de baixo e alto grau, confirmando a caracterização morfológica. Também, alteração numérica, porém não significativa estatisticamente da imunoreatividade dos núcleos das células estromais, próximo de ácinos com lesões proliferativas de alto, baixo grau e também de regiões com a presença de adenocarcinoma bem diferenciado foi observado (Figura 11C e 11D).

O tratamento com o extrato da casca da Jabuticaba promoveu redução significativa da proliferação celular de 52% ($p<0,01$) no grupo JH se comparado com o grupo CH. Já, alterações na proliferação celular não foram evidenciadas no grupo JC em relação ao seu respectivo grupo controle (C16) (gráfico 2.B). Comparando o tecido prostático dos grupos tratados e seus respectivos controles, é possível observar que nos grupos tratados as imunomarcações em núcleos celulares isolados foram

predominantes enquanto nos grupos controles essas encontravam-se em focos isolados.

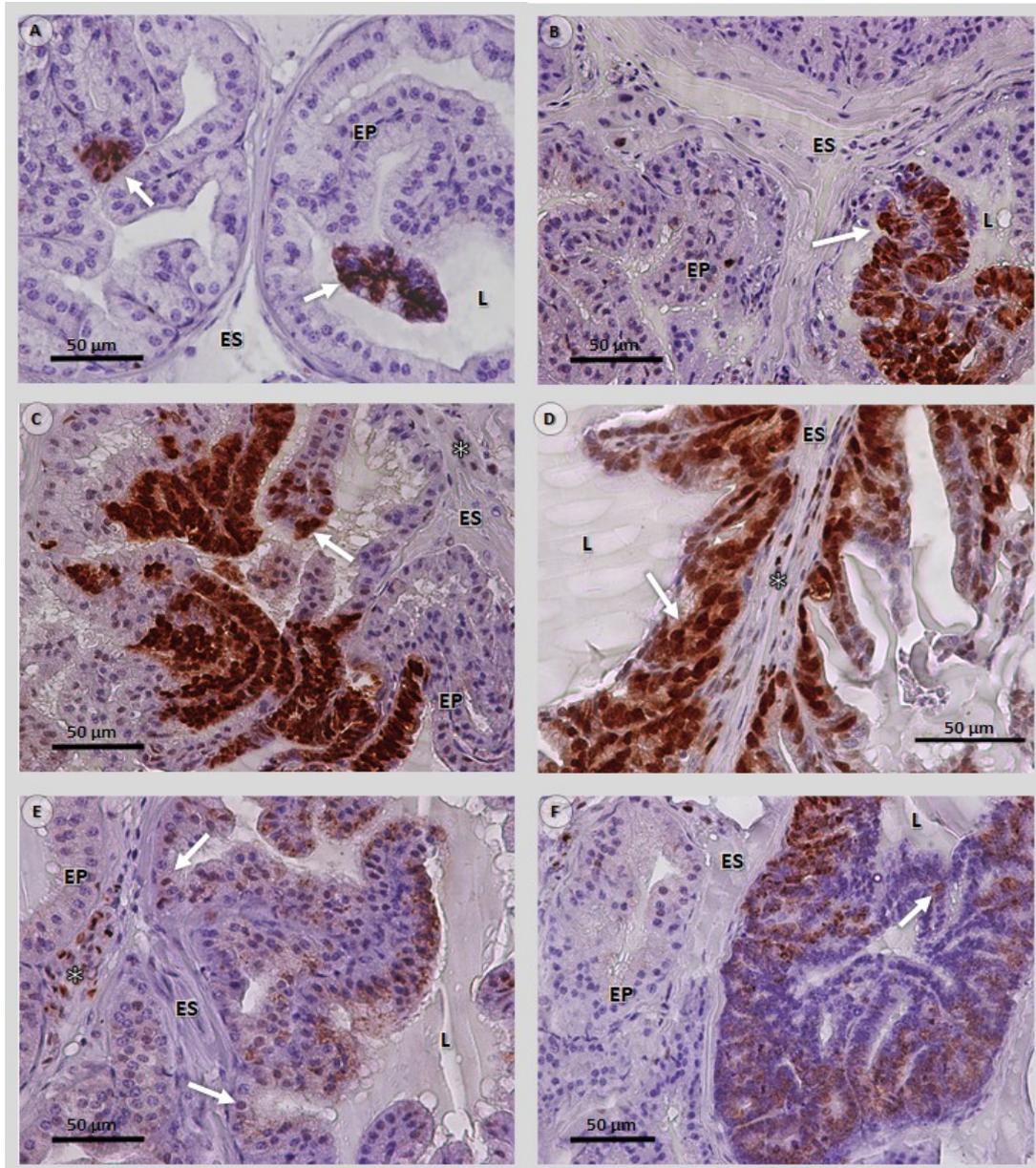


FIGURA 11 – Imunoreatividade positiva para Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) nas células epiteliais (setas) e células musculares estromais (asterisco) do lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP dos grupos: A) Grupo controle/8 semanas de idade (C8); B) Grupo controle/16 semanas de idade (C16); C e D) Grupo controle hiperlipídico/16 semanas de idade (CH); E) Grupo tratado com Jaboticaba (JC); F) Grupo hiperlipídico tratado com Jaboticaba (JH). EP: Epitélio; ES: Estroma; L: Lúmen.

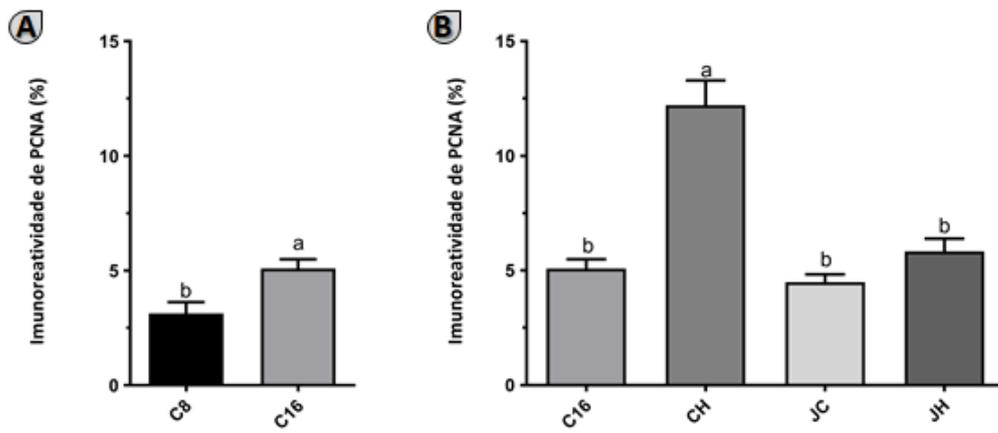


GRÁFICO 2 – Frequência relativa de PCNA no epitélio do lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP dos diferentes grupos experimentais. (A) t-test; (B) ANOVA e Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais e seus respectivos grupos controle (Nível de significância: $p < 0,05$).

5.2.2. α -ACTINA

Imunomarcção positiva para α -actina foi observada ao redor dos ácinos com frequência equivalente a 50% a 70% do estroma prostático nos grupos experimentais (figura 12).

O consumo da HFD e o tratamento com a Jabuticaba não promoveram alterações significativas na frequência da imunomarcção de α -actina no estroma dos grupos experimentais (gráfico 3.2B).

As análises dos níveis proteicos desta proteína, através da técnica de Western Blotting, confirmaram que não houve variações significativas da proteína α -actina com o consumo da HFD ou o tratamento com ECJ (gráfico 3.1B e 3.1C).

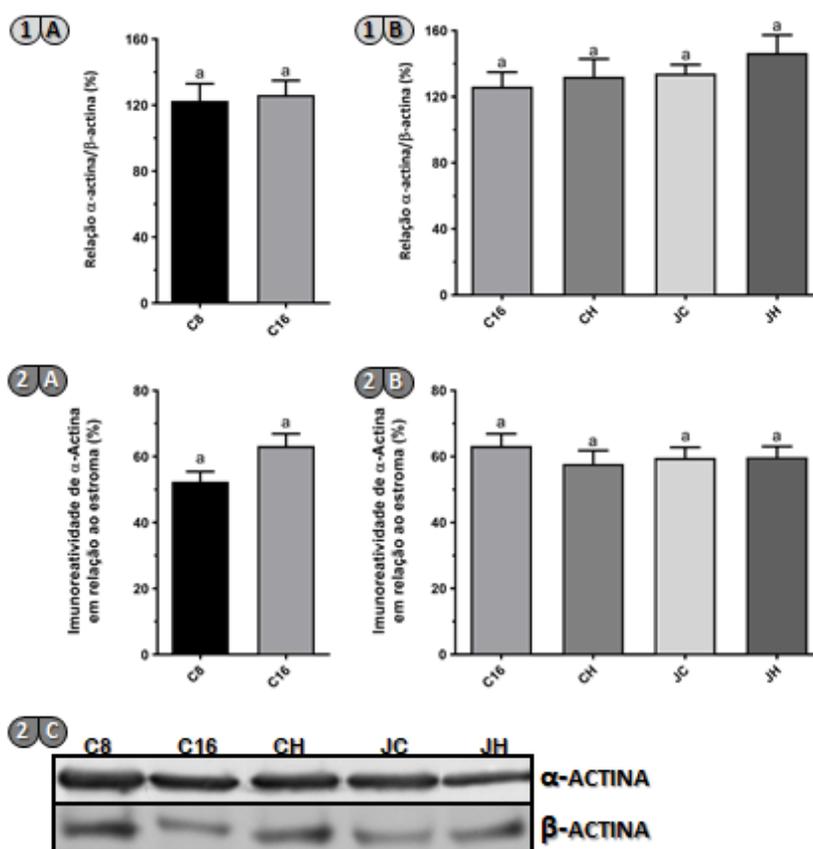


GRÁFICO 3 – Quantificação de nível proteico de α -actina (1) – Densidade relativa de níveis proteicos de α -actina em relação a β -Actina, como controle endógeno (A-C); **Frequência de Imunoreatividade positiva para α -actina (2)** em relação ao estroma no lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP dos diferentes grupos experimentais (A e B). (A) t-test; (B) ANOVA e Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais e seus respectivos grupos controle (Nível de significância: $p < 0,05$).

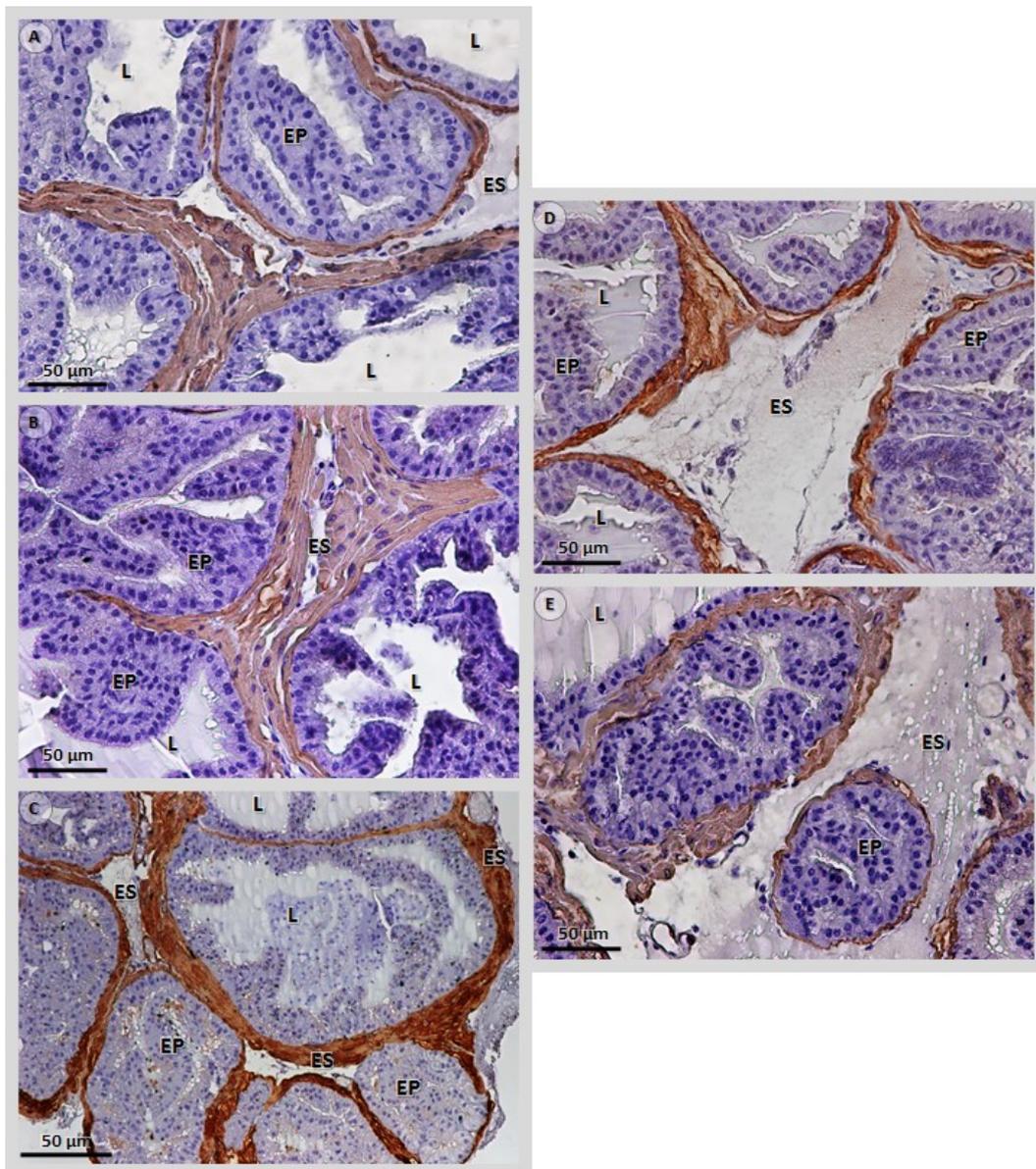


FIGURA 12 – Imunoreatividade positiva de α -actina no lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP dos grupos: **A)** Grupo controle/8 semanas de idade (C8); **B)** Grupo controle/16 semanas de idade (C16); **C)** Grupo controle hiperlipídico/16 semanas de idade (CH); **D)** Grupo tratado com Jaboticaba (JC); **E)** Grupo hiperlipídico tratado com Jaboticaba (JH). EP: Epitélio; ES: Estroma; L: Lúmen.

5.2.3. RECEPTOR DE ANDRÓGENO (AR)

O avanço da idade não promoveu diferenças significativas no nível proteico de AR no grupo controle de 16 semanas (C16) quando comparado ao grupo controle de 8 semanas (C8). Entretanto, aumento percentual de 30% no nível proteico de AR foi observado no grupo C16, se comparado ao C8, indicando a tendência de aumento do mesmo com o avanço da idade.

O consumo da HFD promoveu aumento significativo de 59% ($p < 0,01$) nos níveis proteicos de AR em relação ao grupo controle de 16 semanas de idade (C16), com frequência relativa de 76%.

O tratamento com o extrato da casca da Jabuticaba promoveu diminuição significativa do nível proteico de AR de 53% ($p < 0,01$) e 34% nos grupos experimentais que consumiram a dieta hiperlipídica (JH) e a normolipídica (JC), respectivamente, se comparado com os seus respectivos grupos controle hiperlipídico (CH) e controle normolipídico (C16) (gráfico 4.B).

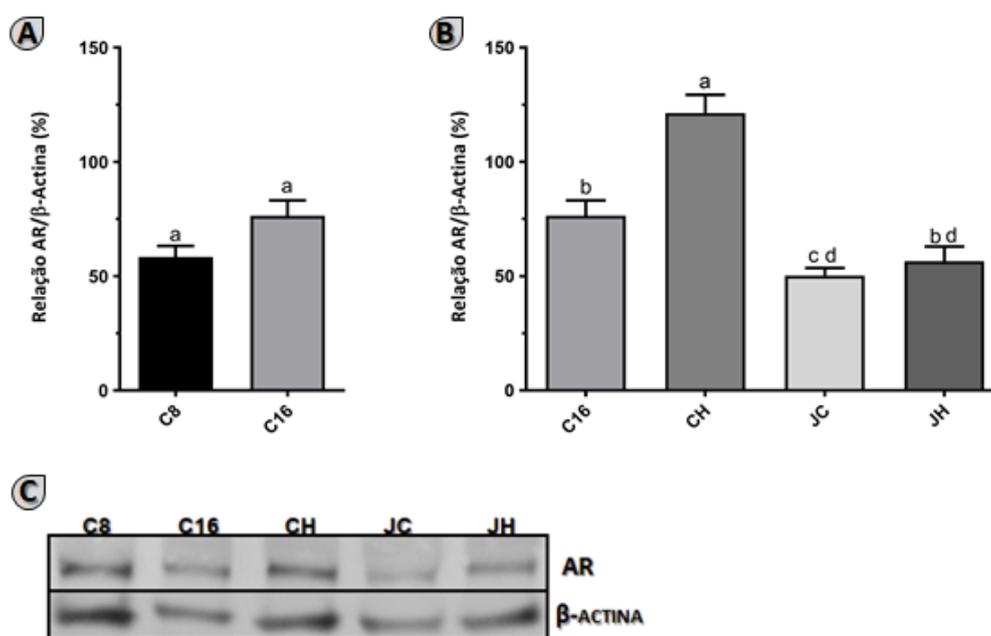


GRÁFICO 4 - Quantificação de nível proteico de Receptor de Andrógeno (AR) no epitélio do lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP dos diferentes grupos experimentais (A-B). Densidade relativa de níveis proteicos de AR em relação ao controle endógeno- β -Actina (C). (A) t-test; (B) ANOVA e Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (Nível de significância: $p < 0,05$).

5.2.4. RECEPTOR DE ESTRÓGENO ALPHA (ER α)

Imunomarcção positiva para receptor nuclear de estrógenos *alpha* (ER α) foi encontrada isoladamente em núcleos e no ápice citoplasmático de células epiteliais nos grupos controles (Figura 13.A e 13.B). Nos grupos experimentais C8 e C16, imunomarcção nuclear foi verificada em focos isolados de proliferação no epitélio com frequência relativa de 2,9% e 3,7%, respectivamente (gráfico 6.2A).

A progressão da idade ocasionou aumento significativo da frequência relativa do receptor de ER α de 51% no citoplasma de células epiteliais (figura 13.B e gráfico 6.3A). O estroma foi o compartimento que apresentou maior aumento percentual significativo de 184% ($p < 0,01$) no grupo C16 se comparado ao grupo controle C8, com frequência relativa de 3,4% (gráfico 6.4A). Entretanto, aumento percentual não significativo de 29% foi verificado no núcleo de células citoplasmáticas do grupo C16, se comparado com seu grupo controle (C8) com frequência relativa de 3,9%, indicando a tendência de aumento do mesmo com o avanço da idade (gráfico 6.2A).

Em relação aos níveis proteicos, a progressão da idade ocasionou aumento significativo do receptor de ER α de 42% ($p < 0,01$) no grupo C16, quando comparado ao seu grupo controle C8, o qual apresentou frequência relativa de 61% (gráfico 5A).

O consumo da HFD não promoveu alterações significativas na frequência relativa dos compartimentos estromais ou nos níveis proteicos do receptor de ER α entre os grupos CH e C16 (gráficos 5B, 6.1B, 6.2B, 6.3B, 6.4B e figura 12C). Contudo, aumento percentual nos níveis proteicos de 15% foi verificado, indicando tendência de aumento do mesmo com o consumo da HFD (gráfico 5B).

O consumo do extrato da casca da Jabuticaba não promoveu diminuição na frequência relativa dos compartimentos estromais ou nos níveis proteicos do receptor de ER α com o avanço da idade ou com o consumo da dieta hiperlipídica, se comparando os grupos JC e JH com seus respectivos grupos controle, C16 e CH (gráficos 5B, 6.1B, 6.2B, 6.3B, 6.4B).

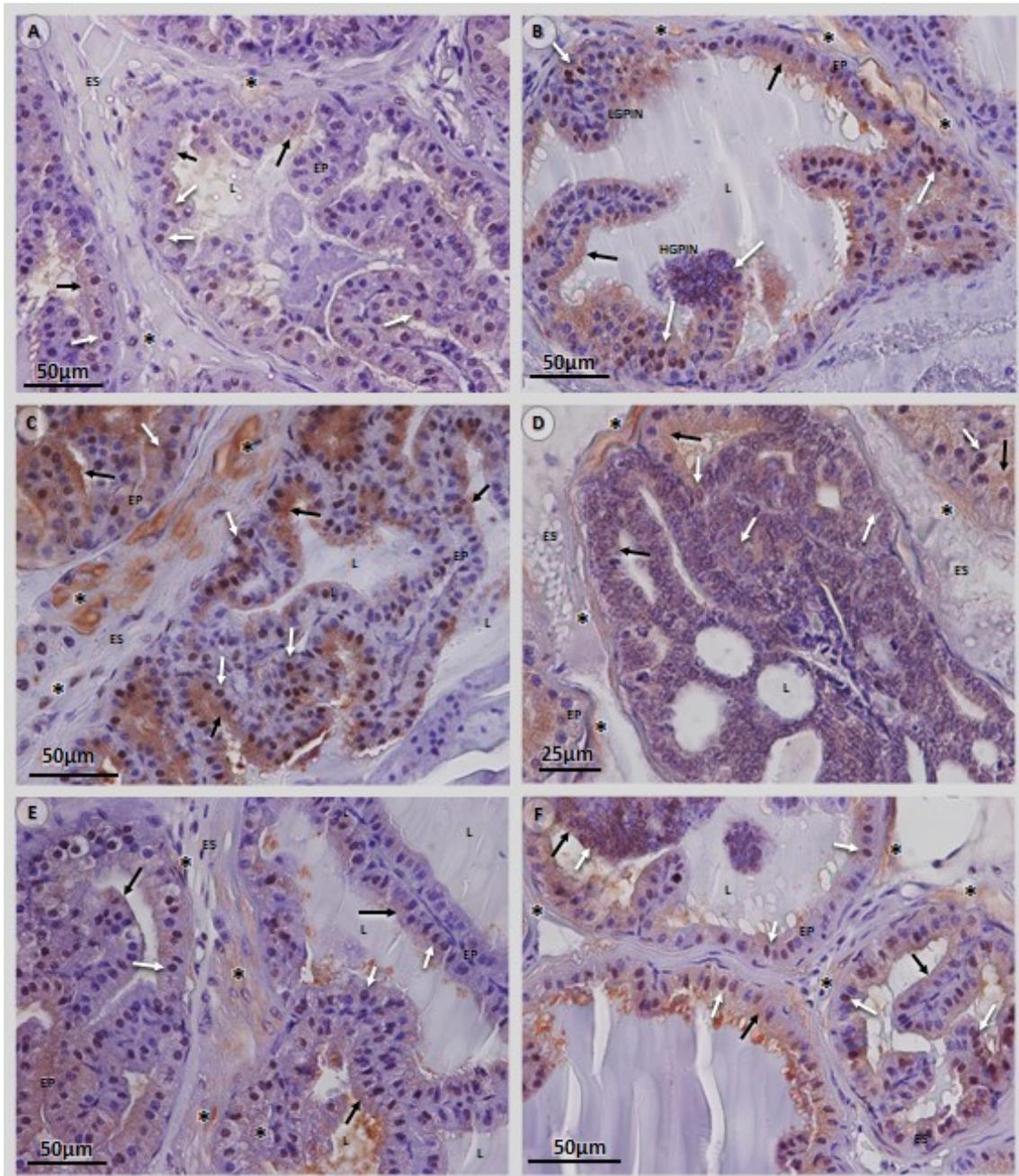


FIGURA 13 – Imunoreatividade positiva para Receptor de Estrógenos ($ER\alpha$) no epitélio (núcleo: seta branca; citoplasma: seta preta) e células musculares estromais (núcleos e citoplasma: asterisco) do lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP dos grupos: **A)** Grupo controle/8 semanas de idade (C8); **B)** Grupo controle/16 semanas de idade (C16); **C)** Grupo controle hiperlipídico/16 semanas de idade (CH); **D)** Grupo controle hiperlipídico/16 semanas de idade (CH) destacando marcação positiva para $ER\alpha$ no epitélio proliferativo com lesões pré-neoplásicas de alto grau (HGPIN); **E)** Grupo tratado com Jabuticaba (JC); **F)** Grupo hiperlipídico tratado com Jabuticaba (JH). EP: Epitélio; ES: Estroma; L: Lúmen.

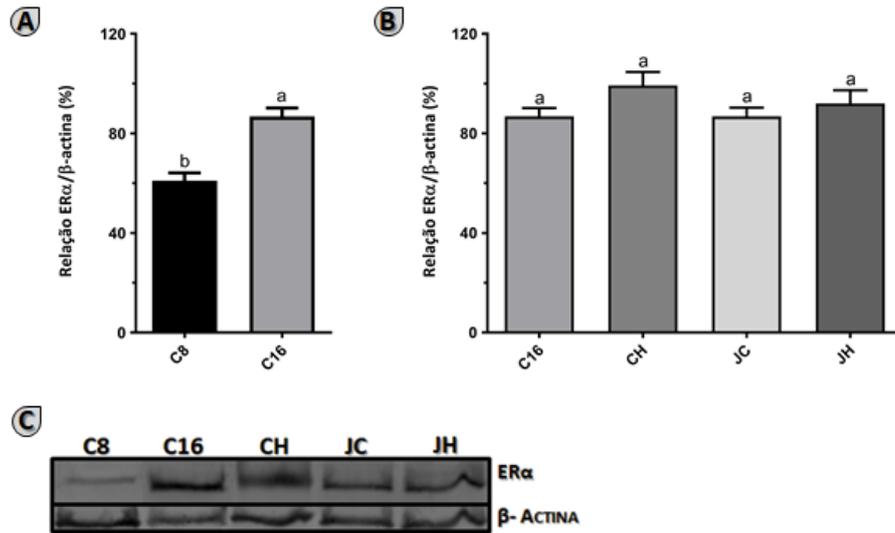


GRÁFICO 5 - Quantificação de nível proteico do Receptor de Estrógeno α (ER α) no lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP dos diferentes grupos experimentais (A e B). Densidade relativa de níveis proteicos de ER α em relação ao controle endógeno- β -Actina (C). (A) t-test; (B) ANOVA e Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (Nível de significância: $p < 0,05$).

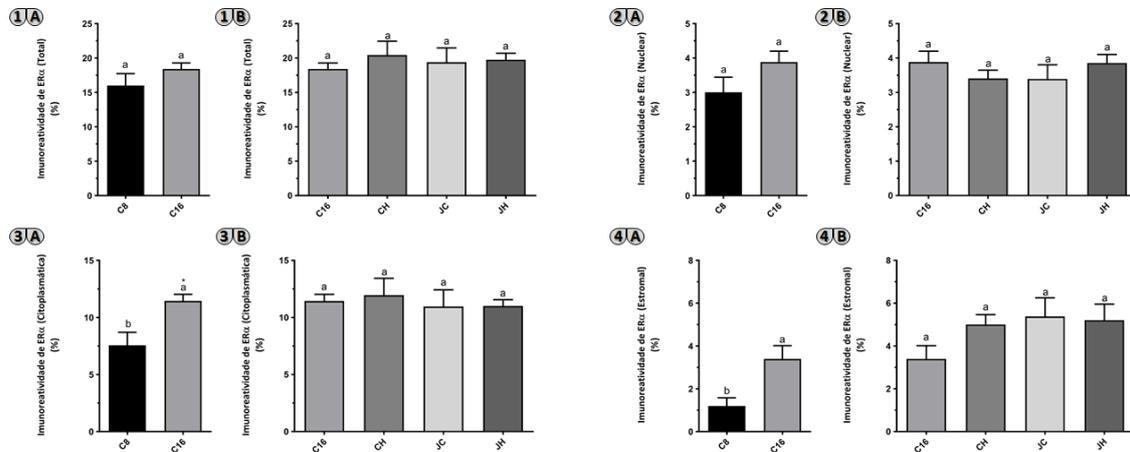


GRÁFICO 6 –Frequência de Imunoreatividade positiva para Receptor de Estrógeno α - ER α (1-4) nos diferentes compartimentos prostáticos: frequência relativa total (1), nuclear (2), citoplasmática (3) e estromal (4) do lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP dos diferentes grupos experimentais. (A) t-test; (B) ANOVA e Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais e seus respectivos grupos controles (Nível de significância: $p < 0,05$).

5.2.5. PROLACTINA

O avanço da idade promoveu aumento significativo de 56% ($p<0,01$) nos níveis proteicos de prolactina no tecido prostático do grupo controle C16, quando comparado ao seu grupo controle C8 (gráfico 7.A).

O consumo da HFD promoveu aumento de 63% ($p<0,01$) nos níveis proteicos de prolactina no tecido prostático anterior dos camundongos TRAMP em relação ao grupo controle C16, com frequência relativa de 39% (gráfico 7.B).

O consumo do extrato da casca da Jabuticaba promoveu redução significativa dos níveis proteicos de prolactina de 60% ($p<0,01$) quando associado ao consumo de HFD, se comparado ao controle hiperlipídico (CH), com frequência relativa de 32% (gráfico 7.B). Em contrapartida, o extrato da casca de Jabuticaba não promoveu alterações significativas quando associado à dieta normolipídica, na comparação com o seu respectivo grupo controle (C16) (Gráfico 7.B).

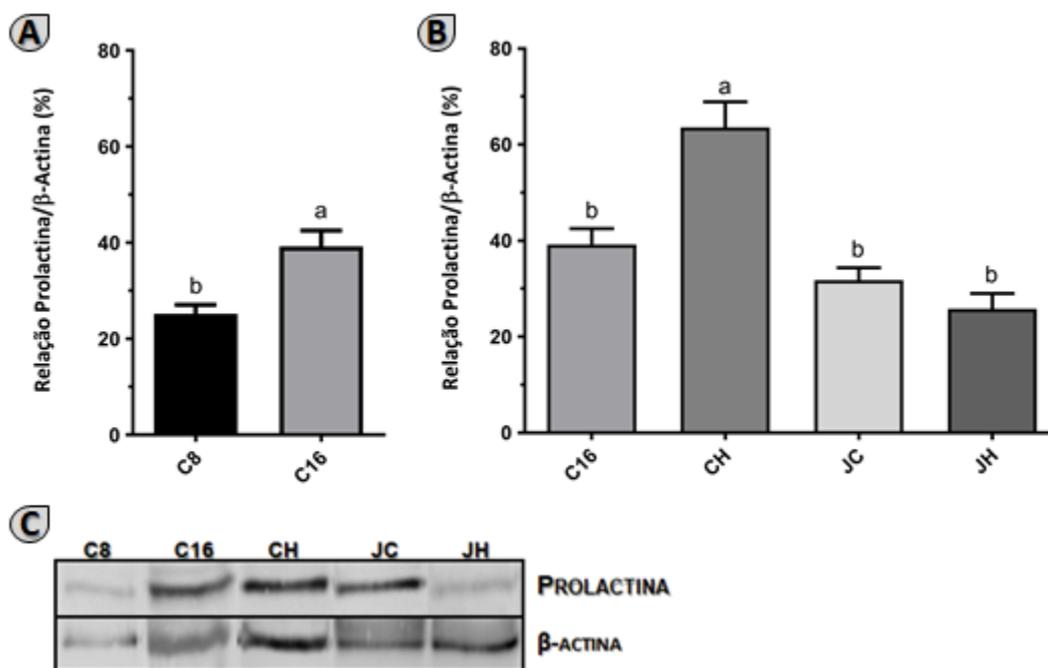


GRÁFICO 7 - Quantificação de nível proteico de Prolactina no lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP dos diferentes grupos experimentais (A-B). Densidade relativa de níveis proteicos de Prolactina em relação a β -Actina, como controle endógeno (C). (A) t-test; (B) ANOVA e Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais e seus respectivos grupos controles (Nível de significância: $p<0,05$).

5.2.6. FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)

O avanço da idade nos camundongos TRAMP com 16 semanas de idade (C16) não promoveu diferenças significativas nos níveis proteicos de VEGF se comparado ao grupo controle C8 (gráfico 8.A).

O consumo da HFD promoveu aumento significativo de 114% ($p < 0,01$) nos níveis proteicos de VEGF no tecido prostático em relação ao grupo controle C16, tendo esse último frequência relativa de 61% (gráfico 8.B).

O consumo do extrato da casca da Jabuticaba no grupo JH, promoveu diminuição de 43% ($p < 0,01$) dos níveis proteicos de VEGF, quando comparado ao respectivo grupo CH, apresentando esse último grupo frequência relativa de 131% (gráfico 8.B). Em contrapartida, o extrato da casca de Jabuticaba não promoveu alterações significativas quando associado à dieta normolipídica, na comparação com o seu respectivo grupo controle (C16) (gráfico 8.B).

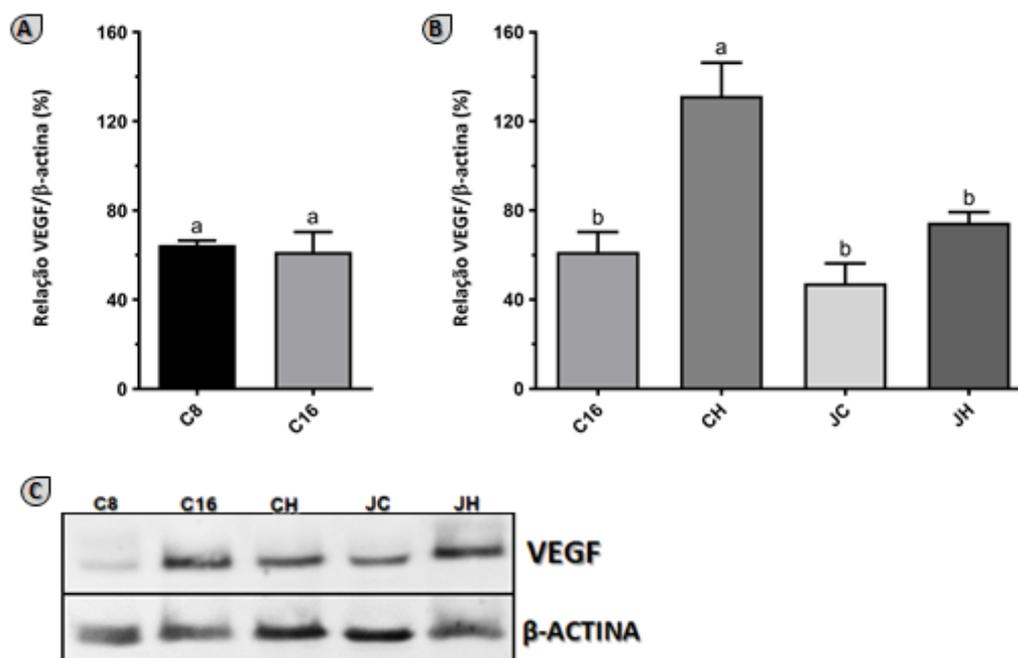


GRÁFICO 8 - Quantificação de nível proteico de Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) no lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP dos diferentes grupos experimentais (A-B). Densidade relativa de níveis proteicos de VEGF em relação a β-Actina, como controle endógeno (C). (A) t-test; (B) ANOVA e Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais e seus respectivos grupos controles (Nível de significância: $p < 0,05$).

5.2.7. RECEPTOR 3 DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLÁSTICO (FGFR3)

Imunoreatividade positiva para FGFR3 foi observada em núcleos celulares epiteliais isolados e ápice citoplasmático de células epiteliais no lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP (figura 14A e 14B). No estroma, imunoreatividade para FGFR3 foi observada no núcleo e citoplasma de células musculares lisas da camada fibromuscular do estroma do lobo anterior da próstata (figura 14B e 14D).

O avanço da idade não promoveu alterações significativas na frequência relativa da imunoreatividade total de FGFR3 nos camundongos TRAMP de 16 semanas de idade (C16) se comparado com seu grupo controle C8 (gráfico 9.1A). Entretanto, dentre os compartimentos prostáticos, o citoplasma foi o que apresentou maior aumento percentual significativo (45%) no grupo controle C16 se comparado ao grupo controle C8, com frequência relativa de 7,6% (gráfico 9.2A).

O consumo de HFD não promoveu alterações significativas na frequência relativa da imunoreatividade total de FGFR3 no tecido prostático de camundongos TRAMP, quando comparado com seu respectivo controle C16 (gráfico 9.1B).

O tratamento com o extrato da casca da Jabuticaba não promoveu alterações significativas na frequência relativa da imunoreatividade total de FGFR3 no tecido prostático de camundongos TRAMP nos grupos que consumiram a dieta hiperlipídica (JH) ou a normolipídica (JC), quando comparado com seus respectivos grupos controles (CH e C16) (gráfico 9.1B).

Entretanto, aumento numérico não significativo de 65% e 39% foram observados no estroma dos grupos JC e JH, respectivamente, quando comparado com seus grupos controles (C16 e CH, respectivamente), indicando a tendência de aumento do mesmo com o tratamento do ECJ (gráfico 9.4B).

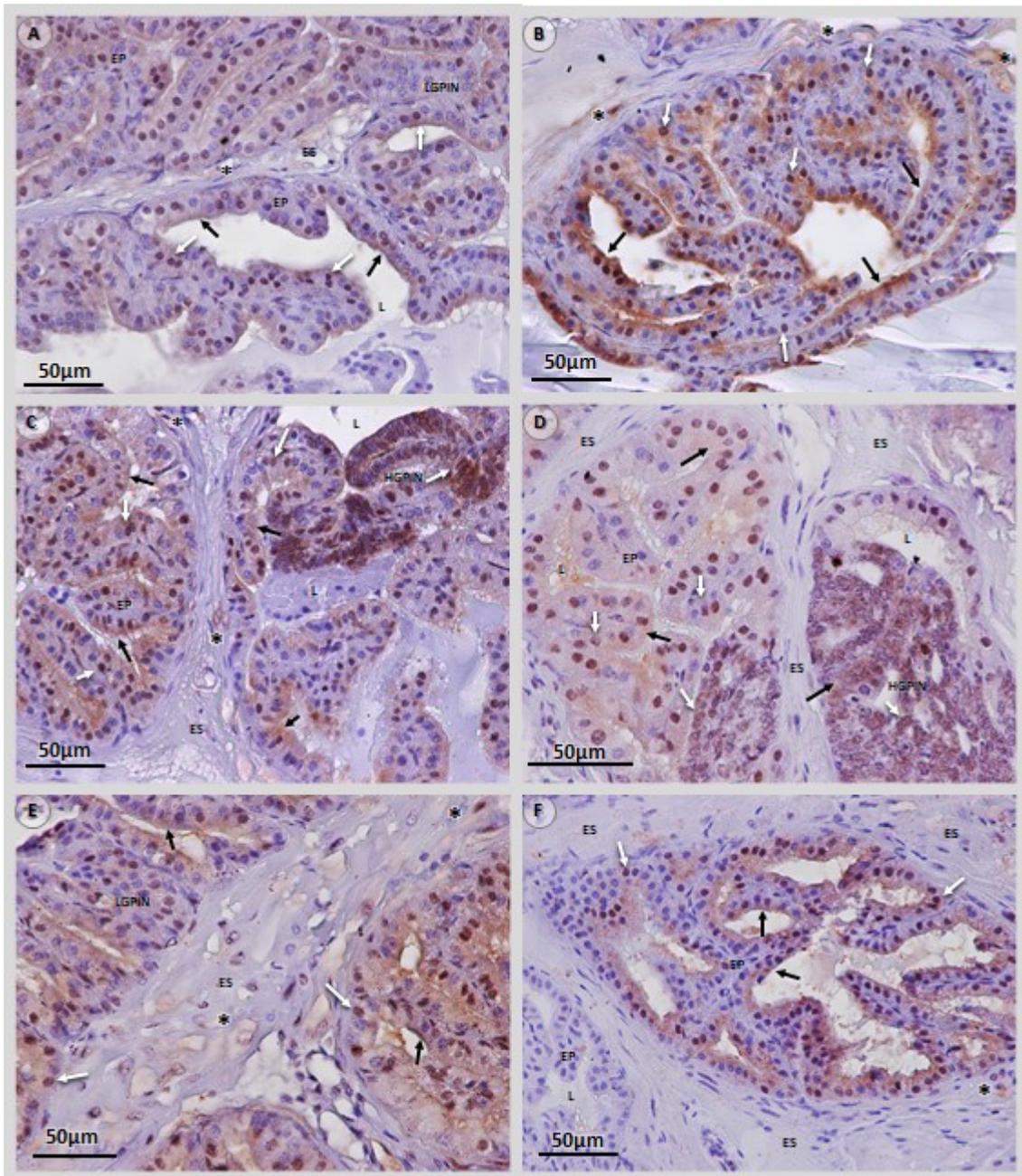


FIGURA 14 – Imunoreatividade positiva para Receptor 3 de Fatores de Crescimento Fibroblásticos (FGFR3) no epitélio (núcleo: seta branca; citoplasma: seta preta) e células musculares estromais (núcleos e citoplasma: asterisco) do lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP dos grupos: **A)** Grupo controle/8 semanas de idade (C8); **B)** Grupo controle/16 semanas de idade (C16); **C)** Grupo controle hiperlipídico/16 semanas de idade (CH); **D)** Grupo controle hiperlipídico/16 semanas de idade (CH) destacando marcação positiva para FGFR3 no epitélio proliferativo com lesões pré-neoplásicas de alto grau (HGPIN); **E)** Grupo tratado com Jaboticaba (JC); **F)** Grupo hiperlipídico tratado com Jaboticaba (JH). EP: Epitélio; ES: Estroma; L: Lúmen; HGPIN: lesão pré-neoplásica de alto grau.

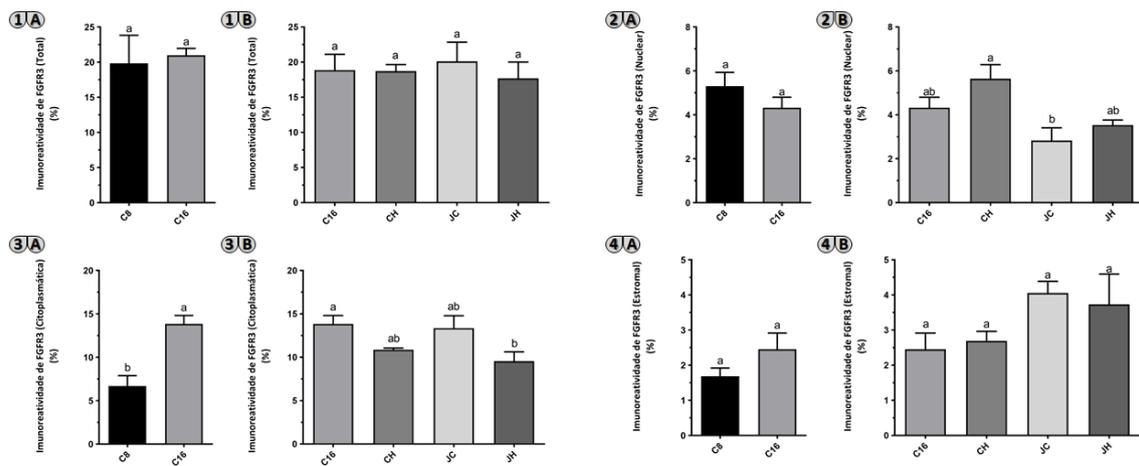


GRÁFICO 9 - Freqüência de imunoreatividade positiva para FGFR3 (1-4) nos diferentes compartimentos prostáticos: freqüência relativa total (1), nuclear (2), citoplasmática (3) e estromal (4) do lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP dos diferentes grupos experimentais. (A) t-test; (B) ANOVA e Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais e seus respectivos grupos controles (Nível de significância: $p < 0,05$).

5.2.8. FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- β)

O avanço da idade promoveu aumento significativo de 19% ($p < 0,01$) nos níveis proteicos de TGF- β no tecido prostático do grupo controle C16, quando comparado ao seu grupo controle C8 com frequência relativa de 61% (gráfico 10.A).

O consumo da HFD promoveu aumento significativo de 23% nos níveis proteicos de TGF- β no tecido prostático em relação ao grupo controle C16, apresentando esse último frequência relativa de 99% ($p < 0,01$).

O consumo do extrato da casca da Jabuticaba no grupo que consumiu dieta hiperlipídica, promoveu diminuição significativa de 28% ($p < 0,01$) dos níveis proteicos de TGF- β se comparado ao seu grupo controle hiperlipídico (CH), apresentando esse último frequência relativa de 121% (Gráfico 10.B).

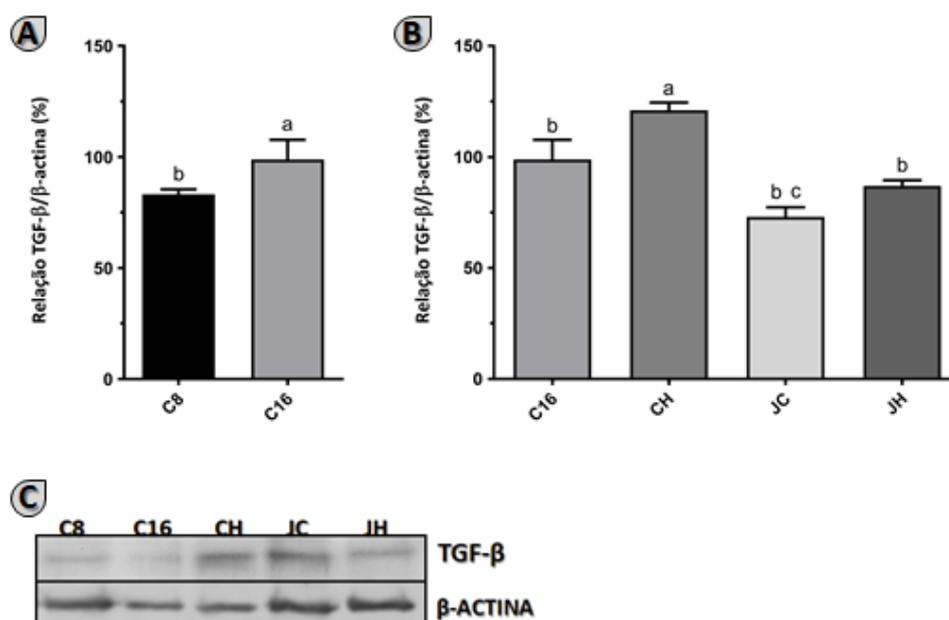


GRÁFICO 10 – Quantificação de nível proteico de Fator de Crescimento Transformante Beta (TGF- β) no lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP dos diferentes grupos experimentais (A-B). Densidade relativa de níveis proteicos de TGF- β em relação a β -Actina, como controle endógeno (C). (A) t-test; (B) ANOVA e Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (Nível de significância: $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Nas análises morfológicas do presente estudo, os grupos controles de 8 e 16 semanas apresentaram predominância de tecido saudável na próstata anterior de camundongos TRAMP, havendo diferença numérica estatisticamente significativa de 10% entre os grupos, caracterizando o avanço de processos proliferativos com o aumento da idade, confirmado pela imunomarcagem com PCNA. Também, o avanço da idade promoveu aumento das lesões proliferativas e alterações hormonais com aumento dos níveis de ER α e Prolactina.

O grupo controle que consumiu HFD, com 35% de gordura, apresentaram predominância de tecido saudável, com diferença menor de 10% em relação a lesão predominante. Apesar deste grupo se apresentar saudável, lesões morfológicas características de HGPIN foram encontradas, além de focos de atrofia epitelial e hipertrofia estromal. Comparando a incidência de lesões encontradas neste grupo com o grupo controle de 16 semanas (C16), houve aumento significativo na proliferação celular, como mostrado pela imunomarcagem de PCNA, e consequente aumento da lesão NIP de alto grau, e embora não significativo, também ocorreu a tendência de aumento de adenocarcinoma bem diferenciado. Também, foi capaz de gerar alterações endócrinas no tecido prostático ao promover aumento dos níveis proteicos dos receptores androgênicos (AR) e de prolactina. No estroma, aumento nos níveis de VEGF, FGFR3 nuclear e TGF- β estiveram presentes.

O TRAMP é um dos modelos para estudos de câncer de próstata que tem sido frequentemente utilizado devido a sua semelhança com o câncer que acomete humanos quanto ao desenvolvimento, evolução e marcadores moleculares envolvidos nos diferentes estágios da doença (GREENBERG et al., 1995; KIDO et al., 2019). Outros fatores importantes são sua alta especificidade com o epitélio prostático para desenvolvimento da doença, além desta se desenvolver num curto período de tempo, aproximado de 10 a 20 semanas, e apresentar lesões neoplásicas com características histológicas progressivas e específicas de acordo com as semanas de vida do modelo (BERMAN-BOOTY et al., 2012; GINGRICH et al., 1996; KIDO et al., 2019).

O TRAMP apresenta lesões intraepiteliais prostáticas de baixo grau (LGPIN) entre 4 e 6 semanas de idade. Entre 6 e 10 semanas de idade há a presença de lesões intraepiteliais de alto grau (HGPN), caracterizada pelo aumento da estratificação do epitélio secretor apresentado em formas cribriformes. Já entre 10 e 16 semanas de idade é possível encontrar descontinuidade da membrana basal e extravasamento de células epiteliais para o lúmen, caracterizando adenocarcinoma bem diferenciado. Nesta faixa de idade, há também desenvolvimento de hiperplasia e hipertrofia estromal. Entre a 18ª e a 24ª semana, os camundongos já apresentam tumores indiferenciados e processos metastáticos (GINGRICH et al., 1999).

A próstata de camundongos é subdividida em pares de lobos, nomeados de acordo com seu posicionamento ao redor da uretra, sendo: lobos ventral, dorsolateral e anterior (ou glândula de coagulação). Dado as diferenças de ramificações durante a morfogênese, cada lobo tem características histológicas e modulações hormonais distintas (MARKER et al., 2003). O lobo anterior diverge dos outros lobos prostáticos aos apresentar mucosa epitelial prostática com maior taxa de pregueamento e baixa taxa de progressão do adenocarcinoma de próstata (BERMAN-BOOTY et al., 2012; SUTTIE et al., 2003).

Berman-Booty *et al.* (2012) observaram em seu estudo com camundongos TRAMP de 18 e 24 semanas de idade, que nos lobos ventral, dorsal e lateral o adenocarcinoma pouco diferenciado foi a lesão de maior incidência (64,3%, 64,3% e 52,4%, respectivamente), enquanto no lobo anterior, 59,5% do epitélio prostático não apresentava lesões pré-neoplásicas ou adenocarcinoma de próstata. Suttie *et al.* (2003), ao propor esquema para caracterização das lesões pré-neoplásicas, observaram que o desenvolvimento e progressão das lesões no lobo anterior ocorrem com menor severidade e de maneira independente dos outros lobos prostáticos, característica que já havia sido observada por Gingrich *et al.* (1996, 1999).

O lento desenvolvimento e progressão do adenocarcinoma de próstata no lobo anterior pode ser observado ao comparar os resultados obtidos por Kido *et al.* (2016) e Silva *et al.* (2018). As análises morfológicas realizadas por Silva *et al.* (2018) no lobo

anterior da próstata de camundongos TRAMP, demonstraram que com 8 semanas de idade, 88% do epitélio prostático de camundongos TRAMP era saudável a lesão intraepitelial de baixo grau (LGPIN) foi a de maior incidência (10%). Com 12 semanas de idade, 72% do epitélio prostático se manteve saudável enquanto 20% deste apresentava LGPIN, mantendo-se como a lesão de maior incidência. Com 22 semanas de idade, 50% do epitélio prostático era saudável enquanto a lesão intraepitelial de alto grau (HGPIN) foi a de maior incidência (30%). Já, as análises morfológicas realizadas por Kido *et al.* (2016) no lobo ventral da próstata de camundongos TRAMP demonstram que com 8 semanas de idade 40% do epitélio ventral prostático permanecia saudável, enquanto 50% deste apresentava LGPIN e 7% apresentava HGPIN. Com 12 semanas de idade, apenas 20% do epitélio permanecia saudável, LGPIN e HGPIN tinham 40% e 25% de incidência, respectivamente. Com 22 semanas de idade, menos de 5% do epitélio glandular permanecia saudável, enquanto HGPIN apresentava 48% de incidência, o adenocarcinoma diferenciado apresentava 6% de incidência e 60% dos camundongos apresentavam adenocarcinoma indiferenciado.

Estudos realizados com os lobos prostáticos de camundongos TRAMP confirmam os resultados obtidos por Silva *et al.* (2018) e Kido *et al.* (2016). Mateus *et al.* (2019) verificaram predominância de LGPIN (45%) e incidência de 30% de HGPIN no lobo ventral de camundongos TRAMP com 18 semanas de idade. Pangrazi *et al.* (2018), verificaram predominância de LGPIN no grupo controle de 8 semanas e HGPIN nos grupos controles de 12 e 16 semanas de idade no lobo dorsolateral. Já Alves *et al.*, (2018), verificaram predominância de tecido saudável (96%) no lobo anterior da próstata com diminuição de 30% na incidência com o aumento da idade, nos grupos controle de 8, 12 e 16 semanas.

Em conjunto, os resultados destes estudos reafirmam a lenta progressão das lesões neoplásicas no lobo anterior, de menor agressividade, em comparação com a progressão destas lesões em outros lobos dos camundongos TRAMP. Entretanto, os resultados deste estudo confirmam o avanço das lesões neoplásicas com o aumento da idade dos camundongos TRAMP, também no lobo anterior da próstata.

A obesidade é uma doença crônica não transmissível com causas distintas. Os maus hábitos alimentares e alto consumo de alimentos gordurosos são os principais fatores que contribuem para o acúmulo de gordura corporal e, conseqüentemente, favorecem o surgimento e agravamento de quadros de sobrepeso e obesidade (HUBERT, 1982; KOPELMAN, 2000).

Ainda, o acúmulo de gordura visceral é conhecido por apresentar risco maior a saúde do que o acúmulo geral de gordura, por ser capaz de produzir modificações hormonais e sistêmicas podendo gerar inflamações locais, que contribuem para o desenvolvimento de lesões neoplásicas (BIRBACH et al., 2011; PONGCHAIYAKUL et al., 2005; TOREN; MORA; VENKATESWARAN, 2013). Conforme o consumo e acúmulo de gordura no organismo, há aumento na produção e secreção de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias (GREENFIELD; CAMPBELL, 2006; POWELL, 2007; SHANKAR et al., 2012), gerando a ativação e recrutamento de macrófagos e linfócitos, resultando nos focos de processos inflamatórios nos tecidos alvos (SHANKAR et al., 2012; YAMAUCHI; ITO; MIYAJIMA, 2010). Estudos anteriores estabeleceram a relação entre o processo inflamatório e o desenvolvimento do câncer de próstata (FUJITA et al., 2019; MATEUS et al., 2019; PARIKESIT et al., 2016; SHANKAR et al., 2012).

O consumo de dieta rica em 30% de lipídios está diretamente relacionado ao aumento do desenvolvimento e progressão do câncer de próstata, além de diminuir a sobrevivência dos camundongos TRAMP de 24 a 50 semanas de idade (CHO et al., 2015). Hu *et al.* (2018) afirmaram que animais de 22 semanas que consumiram dieta rica em 40% de lipídios apresentaram adenocarcinoma pouco diferenciadas, se comparadas ao grupo controle de mesma idade, além de alterações nos níveis de adipocinas e citocinas de acordo com o período de consumo da dieta hiperlipídica.

Park *et al.* (2013) observaram que o consumo de uma dieta rica em 45% de lipídios estava diretamente relacionado ao desenvolvimento e progressão do câncer em estágios iniciais da doença em camundongos TRAMP com 16 semanas de idade. Os grupos experimentais que receberam a HFD, apresentaram diferença significativa na incidência de lesões intraepiteliais prostáticas (PIN) de baixo e alto grau nos lobos lateral

e dorsal, quando comparado aos grupos controle, enquanto os lobos anterior e ventral também apresentaram um aumento não significativo.

Em conjunto, estes resultados confirmam os achados deste presente estudo de que o consumo de HFD favoreceu o aumento da incidência de lesões prostáticas, agravando a progressão do câncer de próstata em camundongos TRAMP. Apesar do epitélio saudável ser numericamente predominante neste grupo, lesões neoplásicas de alto grau significativamente predominantes foram verificadas em relação as outras lesões, sendo sua incidência semelhante ao de epitélio saudável.

Os andrógenos são hormônios esteroides os quais são produzidos, em sua maioria, pelas células de Leydig, nos testículos e secretado como testosterona. O restante é produzido pelo córtex da glândula adrenal como dehidroepiandrosterona que pode ser convertida em testosterona por outros tecidos (BRUCHOVSKY; WILSON, 1968; QUIGLEY et al., 1995; SO; HURTADO-COLL; GLEAVE, 2003). A produção de testosterona pelos testículos se dá através do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. O hormônio liberador de gonadotrofina secretado pelo hipotálamo estimulará a secreção de hormônio luteinizante (LH) pela glândula pituitária. Esta, por sua vez, atua nas células de Leydig, induzindo a produção de testosterona. A produção de testosterona é regulada por feedback negativo através do hormônio luteinizante via eixo gônada-hipotálamo-hipófise (BRUCHOVSKY; WILSON, 1968; SO; HURTADO-COLL; GLEAVE, 2003).

A testosterona é o principal hormônio androgênico circulante (MELMED et al., 2016). No sangue, encontra-se associado a glicoproteína globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) e proteína albumina. A SHBG tem alta afinidade pela testosterona, regulando a quantidade de testosterona disponível para atuar nos tecidos. Apenas 1% a 2% da testosterona circulante é encontrada dissolvida no soro. Nas células prostáticas, esta testosterona circulante é convertida, pela enzima 5 α -redutase tipo II (SRD5A2), em di-hidrotestosterona (DHT), em sua forma mais ativa e com maior afinidade ao receptor de andrógenos (BRINKMANN et al., 1999; MELMED et al., 2016; QUIGLEY et al., 1995).

O receptor de andrógenos (AR) é membro da superfamília de receptores nucleares esteróide-tireóide-retinóide. Apesar de sua ativação ocorrer também através da testosterona, a di-hidrotestosterona (DHT) forma complexo de 3 a 10 vezes mais estável e potente com o AR. Esta ativação promove modificação conformacional no AR, resultando em formação de complexos homodímeros que interagem com os elementos responsivos aos andrógenos (ARES, do inglês *Androgen Response Elements*) na região promotora dos genes alvos, ativando o aparato transcricional, estimulando ou inibindo transcrição dos genes alvo (BRUCHOVSKY; WILSON, 1968; HEINLEIN; CHANG, 2002; MCKENNA; LANZ; O'MALLEY, 1999; ROY et al., 1998; SHIOTA et al., 2019).

Diversos mecanismos podem contribuir para a progressão do câncer de próstata ao gerar as respostas biológicas dos andrógenos através da transativação de seu receptor. Estudos anteriores mostram que fatores de crescimento e citocinas, como IGF1, KGF e IL6 são capazes de aumentar a atividade dos receptores de andrógenos sem a presença deste hormônio (CHAN et al., 1998; CULIG et al., 1994; DIGIOVANNI et al., 2000; HOBISCH et al., 1998).

Ishii *et al.* (2019) observaram que fibroblastos provenientes do estroma tumoral, circundando as regiões com adenocarcinoma de próstata, secretam fatores ativadores de AR, como EGF, IGF-1 e IL6 que preservam a sinalização deste receptor em células de baixa sensibilidade aos andrógenos (E9 e E10, derivadas da LNCAP) após a terapia de privação de andrógenos (ADT, do inglês *androgen deprivation therapy*). Xu *et al.* (2015) ao analisarem camundongos TRAMP de 20 a 28 semanas de idade que consumiram 40% de dieta hiperlipídica para análises imuno-histoquímicas de IGF1, observaram incidência de 80% e 74% de IGF1 α e IGF1 β , respectivamente. Comparando com seus grupos controles que receberam dieta controle de 16% de lipídios, houve aumento de 50% e 48%, respectivamente.

Em conjunto, os resultados destes estudos indicam que o consumo da dieta hiperlipídica pode promover a progressão do câncer de próstata através do desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas através da sensibilização da via de sinalização de andrógenos através dos receptores androgênicos, intensificando os

efeitos biológicos relacionados a proliferação celular, relacionados a ação androgênica na próstata.

Os andrógenos têm importante função no desenvolvimento do câncer de próstata, entretanto, sabe-se que sozinhos são insuficientes para induzir a tumorigênese (MCPHERSON et al., 2001). Bosland *et al.* (2000) observaram em camundongos Noble que o tratamento combinado de testosterona e estrógeno induzia o câncer de próstata, mas o tratamento com hormônios, separadamente, não culminava na mesma resposta biológica. Resultados semelhantes foram observados por Wang & Wong (1998) e Leav *et al.* (1989). Entretanto, proliferação epitelial prostática induzida por estrógenos é aumentada após tratamento com andrógenos (LEAV et al., 1989), sugerindo que os estrógenos atuam no início de processos malignos enquanto os andrógenos atuam na manutenção e desenvolvimento da doença.

Alterações significativas na relação entre testosterona e estrógenos podem ser relacionadas com o desenvolvimento de doenças prostáticas. O desenvolvimento e progressão do câncer de próstata ocorre com declínio dos níveis séricos de testosterona durante o envelhecimento, apesar de ser uma doença andrógeno-dependente. Conforme o envelhecimento, a síntese e os níveis séricos de testosterona diminuem, entretanto, os níveis de estradiol permanecem inalterados ou aumentam com o avanço da idade (BAULIEU, 2002; BORST; MULLIGAN, 2007; ELLEM; RISBRIDGER, 2010; HINZ, 2007; VERMEULEN et al., 2002).

Estrógenos são hormônios sexuais composto por estrona (E1), estradiol (E2) e estriol (E2). Estas moléculas são hidrofóbicas e atravessam a membrana celular, se ligando a receptores associados a membrana e receptores nucleares estrogênicos, promovendo alterações na transcrição e expressão gênica em diversos órgãos (DOBBS et al., 2019).

Os estrógenos são sintetizados a partir de um substrato androgênico, como a testosterona, pela enzima aromatase (SANTEN et al., 2009; SIMPSON et al., 1994) presente no tecido adiposo, glândula adrenal, testículos e na próstata (BONKHOFF, 2018). Homens que apresentam sobrepeso e obesidade, apresentaram maior atividade

da aromatase, convertendo irreversivelmente a testosterona para estradiol, resultando em níveis séricos elevados de estrogênio (COHEN, 2008).

A utilização de camundongos geneticamente modificados para a supressão (knockout – ArKO) e pra superexpressão (AROM+) de aromatase evidenciaram a importância da relação entre testosterona e estrógenos para a manutenção de epitélio saudável. Em camundongos knockout para aromatase (ArKO), houve desenvolvimento de hipertrofia e hiperplasia prostática, mas não houve malignidade, redução na incidência do câncer de próstata (RICKE et al., 2008). Em contrapartida, altos níveis de estrógenos e baixos níveis de testosterona, promoveram o desenvolvimento de processos inflamatórios com o envelhecimento e o surgimento de lesões pré-neoplásicas (ELLEM; RISBRIDGER, 2010). Estes dados confirmam a necessidade da síntese e presença de estrógenos para o desenvolvimento da doença.

A sinalização celular que desencadeará os efeitos estrogênicos na próstata, são resultados da interação deste hormônio em receptores estrogênicos nucleares específicos α e β (ER α , ER β) (CHRISTOFOROU; CHRISTOPOULOS; KOUTSILIERIS, 2014; CUNHA; MATRISIAN, 2002; RISBRIDGER et al., 2003). Na próstata humana, o ER α é encontrado no estroma, enquanto o ER β é encontrado no epitélio (POWELL et al., 2012). No núcleo, os genes para ER α e ER β estão localizados em cromossomos diferentes (WANG et al., 2005) e possuem efeitos biológicos diferentes: ER α tem ação oncogênica, promovendo proliferação celular, processos inflamatório e o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas, por outro lado, o ER β possui ação protetiva, anti-proliferativa, anti-inflamatória e potencial anti-carcinogênico (ELLEM; RISBRIDGER, 2010; KOWALSKA; PIASTOWSKA-CIESIELSKA, 2016).

Ricke *et al.* (2008) observaram em camundongos *Knockout* para a expressão de ER α que não desenvolveram câncer de próstata após estimulação com testosterona ou estrógenos, enquanto animais *Knockout* para a expressão ER β , não apresentaram diferenças em relação ao camundongo do tipo selvagem (KOWALSKA; PIASTOWSKA-CIESIELSKA, 2016). Estudos observaram diminuição na frequência da expressão de ER β em regiões com lesões neoplásicas malignas, se comparado com regiões que

apresentam lesões benignas, confirmando sua ação anti-proliferativa (LATIL et al., 2001; LEAV et al., 2001).

A obesidade promove resistência à insulina. O aumento compensatório dos níveis de insulina, para manter o controle glicêmico, aumenta a atividade da aromatase e, conseqüentemente, os níveis séricos de estrogênio (WILLIAMS, 2012). O consumo de dieta hiperlipídica por camundongos FVB promoveu intolerância à glicose e resistência à insulina (LAMAS et al., 2018), entretanto a administração do extrato da casca da jabuticaba (ECJ) foi capaz de inibir a resistência à insulina e a intolerância à glicose nesses animais.

Análises de imunoreatividade na próstata ventral de camundongos TRAMP de 8 a 22 semanas de idade identificaram presença de ER β no núcleo, citoplasma e estroma dos ácinos prostáticos. Quantificação da imunoreatividade e dos níveis proteicos de ER α não mostraram alterações com o envelhecimento desses animais (DA SILVA et al., 2017). Outros autores observaram que a expressão de ER α está relacionado com o processo neoplásico na próstata (HÄRKÖNEN; MÄKELÄ, 2004; HETZL et al., 2014). Silva et al. (2018) observaram na próstata anterior de camundongos TRAMP de 8 e 12 semanas o aumento dos níveis de ER α .

No presente trabalho, os estrógenos estiveram presentes colaborando para o início do processo proliferativo e o desenvolvimento as lesões pré-neoplásicas, mas não foram fator significativo para o desenvolvimento e progressão destas lesões. A manutenção dos níveis de receptores de estrógeno *alpha* (ER α) entre os grupos experimentais, em conjunto com os resultados apresentados, mostram que o envelhecimento não foi capaz de promover alterações nos níveis de estrógenos. A porcentagem de conteúdo hiperlipídico e o tipo de gordura consumidos na dieta não foram suficientes para promover alterações numéricas nos níveis de estrógenos. Entretanto, a dieta hiperlipídica foi capaz de alterar a relação entre andrógenos e estrógenos, fator determinante para o início do desenvolvimento do câncer de próstata. Também, há a possibilidade de estarmos diante do efeito protetor do receptor de estrógeno β (ER β), já que o consumo da dieta hiperlipídica não promoveu alterações nos

níveis de ER α e este receptor não foi avaliado neste trabalho. Também, outras análises devem ser realizadas com o ER α para que possa ser certificado que o extrato da casca da jabuticaba não promove alterações através desta via hormonal.

A prolactina (PR) é um hormônio que participa na regulação do crescimento e diferenciação da próstata. A hipófise é a glândula responsável pela secreção sistêmica deste hormônio, mas na próstata sua produção se dá no epitélio glandular prostático de maneira andrógeno-independente. Considerando a presença de receptores para prolactina no epitélio prostático e a produção autócrina deste hormônio, respostas biológicas serão desencadeadas pela ativação dos receptores celulares através da prolactina produzida pelas células epiteliais, desencadeando *looping* autócrino no tecido prostático (COSTELLO & FRANKLIN, 1994; NEVALAINEN *et al.*, 1991; NEVALAINEN *et al.*, 1997.)

A prolactina pode atuar como fator anti-apoptótico andrógeno-independente no epitélio prostático normal, em cultura celular dos lobos ventral e dorsolateral da próstata de ratos Sprague Dawley (AHONEN *et al.*, 1999). Camundongos transgênicos para a superexpressão de prolactina apresentaram hiperplasia prostática (KINDBLOM *et al.*, 2002; WENNBO *et al.*, 1997), enquanto camundongos transgênicos para a supressão de prolactina apresentaram próstatas menores do que as presentes no grupo controle selvagem (KINDBLOM *et al.*, 2003).

Hetzl *et al.* (2016) demonstraram que além da ativação usual da prolactina de maneira andrógeno-independente, essa também pode ocorrer estrógeno-independente, devido ao aumento da reatividade de PR no estroma de camundongos senis Sprague Dawley que sofreram ablação androgênica e estrogênica.

A sinergia entre os andrógenos e a prolactina se dá através da ativação do Transdutor e Ativador de Transcrição 5 (STAT5) (TAN *et al.*, 2008; SALA & GOFFIN., 2014). A família de proteínas STAT é um importante transdutor de sinalização de receptores de citocinas e consiste em oito membros, sendo 4 deles relacionados como transdutor para o receptor de prolactina: STAT 1, STAT 3 e STAT 5, sendo este último codificado por dois pares de genes: Stat5a e Stat5b (IHLE, J.N., 2001). A *Janus-activated kinase* (JAK) é uma

família de ativadores de transcrição responsáveis pela fosforilação das STAT5, provocando a sua homodimerização ou heterodimerização, permitindo a sua translocação para o núcleo visando a ativação de genes promotores (IHLE, J.N., 2001). A ativação e transcrição do gene da prolactina, em células normais ou malignas, se dá através da sinalização da STAT5 (LI *et al.*, 2004; NEVALAINEN *et al.*, 2000).

Os receptores de AR ativam a transcrição através dos elementos responsivos aos andrógenos (ROY *et al.*, 1999). Entretanto, outros estudos evidenciaram que a interleucina-6, responsável pela ativação da STAT3 (IHLE, J.N., 2001) estava relacionada a ativação da expressão gênica de AR (CHEN *et al.* 2000; MATSUDA *et al.*, 2001), atuando através de caminhos alternativos de ativação, não necessitando da testosterona (Bishop *et al.* 2014). As STAT1, STAT 3 e STAT5a/b possuem uma sequência palindrômica (TTCxxxGAA) denominada GAS (HORSEMAN & YU-LEE., 1994), permitindo a ativação de genes promotores por diferentes citocinas (FERRAG *et al.*, 1996; GOUILLEUX *et al.*, 1995). A proximidade entre os genes ativados pela STAT3 e STAT5 permite *crossalking* entre essas moléculas e as regiões promotoras dos genes de andrógenos e da prolactina, categorizando a sinergia entre esses dois hormônios e a andrógeno-independência da ação da prolactina na próstata e no desenvolvimento de tumores (KOIRALA *et al.*, 2014; BAGCHI *et al.*, 2008; FREEMAN *et al.*, 2000). A atuação da prolactina é intrínseca à dos andrógenos, devido a ativação destes genes ser realizada por moléculas semelhantes, promovendo o *crossalking* das moléculas de ativação destes genes.

A dieta hiperlipídica, através dos receptores de prolactina, promoveu a expressão de prolactina, aumentando os processos proliferativos e de crescimento promovidos por este hormônio.

O estroma desempenha importante papel durante a progressão do câncer de próstata e sofre mudanças histológicas e moleculares associadas a doença. O ácino prostático é composto por uma camada de células epiteliais justapostas depositas sobre a lâmina basal, com ápice voltado para o lúmen onde depositam suas secreções. Do lado oposto a lâmina basal, há o estroma fibromuscular composto por fibroblastos, células musculares lisas e matriz extracelular rica em fibras colágenas, que permeiam o ácino

secretor nos dobramentos epiteliais (BARRON; ROWLEY, 2012; MARKER et al., 2003). Lesões epiteliais sofridas repetitivamente durante o processo de envelhecimento, associado a diminuição de andrógenos na regulação da homeostase prostática, acarrete em microambiente de reparo crônico (ROWLEY, 1999; TUXHORN; AYALA; ROWLEY, 2001). Este estado de reparo é fator chave para a promoção de doenças prostáticas, que possuem como ponto em comum o estroma reativo e os processos inflamatórios (BARRON; ROWLEY, 2012).

O compartimento estromal possui plasticidade celular para responder rapidamente as situações emergenciais sofridas pelo epitélio, como no reparo de lesões e interrupção da homeostase. Desta maneira, os componentes estromais presentes no microambiente adjacente ao epitélio, atua em sinergia com o mesmo caso este esteja danificado ou violado (BARRON; ROWLEY, 2012).

Os miofibroblastos são fibroblastos que apresentam um fenótipo intermediário entre fibroblastos e células musculares lisas, considerando a expressão de proteínas do citoesqueleto e aspectos ultra estruturais (GABBIANI; MAJNO, 1972; TOMAS et al., 2010; TUXHORN; AYALA; ROWLEY, 2001; TUXHORN et al., 2002a). A *alpha* actina de músculo liso (α SMA) é um membro da família de proteínas actinas que desempenha papel importante na motilidade, estrutura e integridade celular (HINZ, 2007; MICALLEF et al., 2012; NURMIK et al., 2019). α SMA é um marcador mesenquimal para os miofibroblastos no estroma no câncer de próstata (BARRON; ROWLEY, 2012; TUXHORN et al., 2002a). Citocinas e fatores de crescimento, como IL-6 e TGF- β 1, tem importante atuação no reparo tecidual. TGF-B é conhecido por induzir a diferenciação dos miofibroblastos, além da expressão de α SMA, aumento da deposição de matriz extracelular (HINZ, 2007; MICALLEF et al., 2012).

Apesar de Montico *et al.* (2015) terem caracterizado alterações nos níveis de α SMA em camundongos senis FVB, Mateus *et al.* (2019) não observaram alterações para esta molécula no lobo ventral em decorrência da idade ou do tratamento aplicado aos camundongos TRAMP de 18 semanas. Já (SILVA et al., 2018) observou aumento dos

níveis de α SMA em concordância com a progressão da proliferação no lobo anterior de camundongos TRAMP de 22 semanas de idade.

Apesar de literatura controversa e por este trabalho não ter modificações significativas nos níveis de α SMA com o consumo da dieta hiperlipídica e/ou a administração do extrato da casca da jabuticaba, a alteração numérica observada com o consumo da dieta hiperlipídica é congruente com o aumento nos níveis de α SMA de acordo com o aumento da proliferação celular observado por (SILVA et al., 2018).

O fator de transformação do crescimento *beta* (TGF- β) é uma citocina com efeito estimulador e inibidor do crescimento celular, dependendo do da célula e seu estado de diferenciação (NILSEN-HAMILTON, 1990; SUN et al., 2019). É expresso, principalmente, por células do estroma prostático, modulando o próprio estroma (COSTANZA et al., 2017). Devido às diversas atividades biológicas exercidas pelo TGF- β , sua atividade aumenta durante a neoplasia prostática, associado ao desenvolvimento e progressão tumoral (PERRY; ANTHONY; STEINER, 1997; THOMPSON et al., 1992). TGF- β promove a circulação de oxigênio e nutrientes ao induzir a formação de novos vasos sanguíneos (YANG; MOSES, 1990), protege as células cancerígenas ao suprimir o sistema imune (FONTANA et al., 1992; NILSEN-HAMILTON, 1990) e aumenta a invasividade e capacidade metastática das células malignas ao promover a formação e remodelação da matriz extracelular (SOULITZIS et al., 2006; STEINER; BARRACK, 1992).

Sun et al. (2019) observaram que fibroblastos associados ao câncer (CAFs) superexpressou TGF β , sendo um possível mecanismo de regulação da proliferação e migração das células PC3 em cultura. Yu et al. (2014) obtiveram resultado semelhante com os CAFs-CM (CAFs derivados do estroma de câncer de mama humano) apresentaram superexpressão de TGF β , aumentando a adesão, migração de células cancerígenas MCF-7.

Os níveis de TGF-B são associados com tumores prostáticos agressivos. A ativação de TGF-B, in vivo e in vitro, resultaram em crescimento tumoral mais agressivo, invasivo e aumento a transição epitélio-mesênquimal na próstata humana e de linhagens celulares de câncer de próstata murinos (WU et al., 2015). Com a progressão

do câncer, há a redução nos níveis de TGF- β e a interrupção da sinalização deste fator de crescimento no câncer prostático promove invasividade e metástases pouco diferenciadas (TU et al., 2003).

Montico et al (2015) identificaram em camundongos FVB senis, aumento na atividade de TGF- β conforme o envelhecimento e progressão do adenocarcinoma de próstata. Também, alterações nas atividades de α SMA e vimentina (marcador molecular de miofibroblastos) evidenciam as alterações promovidas pelo TGF- β no estroma devido ao câncer de próstata.

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes, processo utilizado por diversos órgãos para o transporte de oxigênio e nutrientes (TAHERGORABI; KHAZAEI, 2012). A neovascularização é crucial para o crescimento tumoral, dado o crescimento tumoral limitado caso não haja o desenvolvimento do suprimento sanguíneo (GIMBRONE et al., 1972).

A angiogênese é controlada pelo balanço entre indutores e inibidores angiogênicos, sendo diversos fatores de crescimento citocinas e hormônios, como o fator de crescimento endotelial (VEGF)-A, fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de necrose tumoral (TNF α), fator transformante beta (TGF β) e a leptina (CARMELIET; JAIN, 2000). Alterações no equilíbrio de sinalização pró e anti-angiogênicos tornam os processos angiogênicos normais em patológicos, caracterizando o switch angiogênico (BERGERS; BENJAMIN, 2003).

O Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um potente indutor de angiogênese essencial na angiogênese patológica, estimulando a proliferação, migração e aumentando a permeabilidade vascular (FONG et al., 1995; LU et al., 2010). A superexpressão de VEGF é induzida pelo Fator de Indução de Hipóxia (HIF1A) em resposta a alterações na taxa de oxigenação do microambiente prostático (RAJABI; MOUSA, 2017) (DELONG-CHAMPS *et al.* 2016). Dado a necessidade constante de formação de novos vasos sanguíneos recrutada pelo crescimento tumoral, os tumores que secretam VEGF têm rápido crescimento e são capazes de sofrer metástase (SHWEIKI et al., 1992).

Estudos realizados no lobo ventral da próstata de camundongos TRAMP de 16 e 18 semanas de idade indicam não haver alteração na atividade de VEGF com o aumento da idade (DA SILVA *et al.*, 2017, 2019; MONTICO *et al.*, 2015b). Da Silva *et al.* (2019) observaram superexpressão de receptor VEGFR-1 e Montico *et al.*, 2015b observaram aumento da densidade de microvasos sem aumento dos níveis de VEGF. Congruente com os dados da literatura, Alves *et al.*, (2018) categorizaram que o aumento da atividade do VEGF na próstata ventral está associado ao desenvolvimento tumoral em estágios avançados.

A produção de VEGF pelos adipócitos está relacionada à vascularização necessária para o aumento em massa do tecido adiposo. Sendo assim, acredita-se que o acúmulo de tecido adiposo causado pelo sobrepeso e a obesidade contribuem para a elevação de VEGF (SUN *et al.*, 2012).

Fryczkowski *et al.* (2018) observaram aumento significativo dos níveis séricos de VEGF em pacientes de 55 a 75 anos que apresentaram câncer de próstata e hiperplasia benigna prostática. Outros marcadores, como omentina, leptina, HGF e PSA, também foram encontrados elevados em indivíduos com câncer de próstata, sugerindo a associação destes biomarcadores com o risco de desenvolvimento desta doença. Entretanto, Silha *et al.* (2005) observaram que não houve alteração nos níveis séricos de VEGF em homens de 55 a 63 anos de idade que apresentavam sobrepeso (média de índice de massa corporal de 26,7 kg/m²) ou obesidade (índice de massa corporal de 39,8 ± 5,0 kg/m²) comparado ao grupo controle.

A adiponectina, hormônio produzido pelo tecido adiposo, pode desempenhar papel essencial na supressão do desenvolvimento tumoral, interferindo na neovascularização ao inibir a atividade de VEGF. Redução dos níveis de adiponectina foi observado no plasma, tecido prostático e nas linhas celulares para câncer de próstata quando comparado aos indivíduos que apresentaram hiperplasia prostática benigna (HPB) ou controle saudável. Esses dados confirmam a influência do tecido adiposo na neovascularização do câncer de próstata.

Apesar de não ser fator essencial para o desenvolvimento inicial do tumor, a atividade do VEGF é imprescindível para crescimento, invasão e metástase tumoral (PRATHEESHKUMAR et al., 2012). VEGF é considerado o principal modulador da angiogênese e é alvo de terapias antiangiogênicas com foco em reduzir o tamanho ou progressão tumoral. Entretanto, em sua ausência, outras vias podem ser ativadas resultando em desenvolvimento de vasos sanguíneos, como os Fatores de Crescimento Fibroblásticos (FGFs) (FONS et al., 2015).

A sinalização entre o estroma e o epitélio providas pelos diferentes tipos de FGF pode ser fator determinante para a tumorigênese prostática. Níveis elevados de FGF2 estão associados a lesões prostáticas de baixo e alto grau (HUSS et al., 2003). A expressão de FGF10 no estroma promove o desenvolvimento tumoral através da superexpressão de receptores de andrógenos no epitélio. Assim como o FGF10, o FGF7 e o FGF22 atuam no epitélio através do mesmo receptor que o FGF10, o receptor de fatores fibroblásticos 1 (FGFR1) (ABATE-SHEN; SHEN, 2007), que é fator regulador chave na proliferação, progressão do câncer e metástase tumoral (YANG et al., 2013).

Da Silva *et al* (2019) avaliou a atividade do Receptor de Fator de Crescimento Fibroblástico 3 (FGFR3) na próstata ventral de camundongos TRAMP. FGFR3 estava presente no núcleo e citoplasma das células epiteliais. Apesar de não ter havido alterações nos níveis de FGFR3 entre os grupos de 8 e 12 semanas, aumento na atividade deste receptor foi observado no núcleo de camundongos com 16 semanas de idade. Ainda, a redução dos níveis de FGFR3 conforme ocorre a progressão do câncer indica que este receptor não é superexpresso na hiperplasia prostática benigna ou no câncer de próstata.

Hernandez et al (2009) demonstraram que apesar do FGFR3 não desempenhar papel central na patogênese do câncer de próstata, sendo sua atuação associada à presença de lesões de baixo grau.

O TGF- β é uma molécula chave para as modificações estromais em resposta as alterações que ocorrem no epitélio prostático lesionado, promovendo alterações estromais necessárias para a progressão de lesões pré-neoplásicas e adenocarcinoma

de próstata. O VEGF é fator essencial para o crescimento e desenvolvimento tumoral, mas sua atividade na angiogênese patogênica foi dependente do tecido adiposo. Devido ao lento desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas do lobo anterior, o FGFR3 não apresenta forte atuação com o envelhecimento, mas esteve ativo com o aumento da incidência de lesões de baixo grau promovidas pelo consumo da dieta hiperlipídica, confirmando sua influência em estágios iniciais do câncer de próstata, quando os níveis de VEGF estão normais. Os efeitos pró-inflamatórios da dieta hiperlipídica contribuíram para as alterações estromais observadas neste trabalho.

A administração do extrato da casca da jabuticaba (ECJ) foi benéfica, diminuindo os processos proliferativos no grupo experimental que recebeu a dieta hiperlipídica. No grupo experimental que recebeu dieta normolipídica, menor severidade na progressão do adenocarcinoma do lobo anterior da próstata foi verificado. O consumo do ECJ promoveu a redução dos níveis dos marcadores hormonais e estromais aumentados pelo consumo de HFD. Já, alterações significativas na distribuição e incidência de α -actina e ER α não foram identificadas no tecido glandular, embora no grupo que ingeriu dieta hiperlipídica tenha havido alteração numérica.

A natureza tem sido uma fonte de medicamentos por milênios, e durante o século passado, muitas drogas pertinentes foram desenvolvidas a partir de fontes naturais, particularmente das plantas (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009). Frutas e legumes têm sido amplamente utilizadas diariamente devido, não somente as preferências pessoais, mas também aos seus compostos bioativos e nutrientes presentes (ROOSEN et al., 2007). Estudos têm demonstrado a capacidade das frutas e derivados em prevenir ou modular alterações metabólicas observadas após o consumo de dieta rica em lipídeos. (LEITE-LEGATTI et al., 2012; LENQUISTE et al., 2015; SONG et al., 2016).

A Jabuticaba é proveniente de uma árvore frutífera nativa da mata atlântica e de grande ocorrência no Brasil. Possui grande variedade de compostos fenólicos responsáveis pelos seus efeitos benéficos (HO et al., 2010). A casca da Jabuticaba contém altas concentrações de compostos polifenóis, como as antocianinas, que possuem diversos efeitos benéficos para a saúde (LEITE-LEGATTI et al., 2012; LAMAS et al., 2018; LEQUINSTE et al., 2019;). Além das antocianinas, outros compostos fenólicos estão presentes na casca da Jabuticaba, como os taninos, ácido elágico e gálico (ABE et al., 2012 ; LAMAS et al., 2018; LEITE et al., 2011; LEITE-LEGATTI et al., 2012; LENQUISTE et al., 2015; WU et al., 2013).

Leite-Legatti et al. (2012) estudaram o efeito da casca de Jabuticaba em diferentes tipos de células tumorais, e verificaram forte atividade antiproliferativa nos

casos de células de leucemia e câncer de próstata. Os resultados apresentados por Leite-Legatti *et al.* (2012) estão de acordo com os obtidos no presente trabalho, no qual o consumo do ECJ pelos grupos que consumiram dieta normolipídica apresentaram aumento significativo de epitélio saudável e diminuição de lesões neoplásicas graves, como HGPIN e WDA.

Dado a atividade antioxidante, anti-inflamatória e antiangiogênica dos compostos fenólicos presentes na casca da jabuticaba, o seu consumo pode reduzir os fatores de risco para doenças cardiovasculares (WALLACE; SLAVIN; FRANKENFELD, 2016), suprimir a proliferação celular em alguns tipos de câncer (LIN, *et al.*, 2017), previne a diabetes e a esteatose hepática (LAMAS *et al.*, 2018), reduzir a inflamação causada pela obesidade e suas doenças associadas (LEE *et al.*, 2017), além de reduzir a secreção de adipocinas produzidas pelo tecido adiposo (DEFURIA *et al.*, 2009; GANAPATHY *et al.*, 2010; SEYMOUR *et al.*, 2009).

A casca da jabuticaba pode ser consumida através da fruta, em pó adicionada na alimentação ou através de extratos. O extrato apresenta maior concentração de compostos bioativos quando comparado com o consumo da fruta ou da casca em pó, permitindo obter consumo semelhante, mas com dose menor. Além disto, a ingestão da casca da jabuticaba em forma de extrato permite o controle preciso da dose a ser consumida. O extrato desenvolvido por Lamas *et al.*, (2018), avaliado em sua composição e utilizado neste estudo, apresentou concentração superior de conteúdos fenólicos e na capacidade antioxidante se comparado aos extratos presentes na literatura, obtidos por meio da extração metanólica e aquosa (LEQUINSTE *et al.*, 2015). Dentre os compostos bioativos presentes neste extrato, pode-se evidenciar as antocianinas, ácido elágico, ácido gálico, epicatequinas, quercetina, naringenina, rutina e o ácido ascórbico (LAMAS *et al.*, 2018).

As antocianinas podem atuar na prevenção do câncer de próstata em diversos estágios da doença (LIN *et al.*, 2017). Apresenta, nos estágios iniciais da tumorigênese propriedades antioxidantes, diminuindo os níveis de radicais livres e os danos causados estresse oxidativo, reduzindo as transformações malignas celulares e a ocorrência de

tumores (BOWEN-FORBES; ZHANG; NAIR, 2010; LI et al., 2015; SHIH; YEH; YEN, 2007; YI et al., 2010). As antocianinas podem atuar na via anti-inflamatória ao inibir a expressão de fatores inflamatórios, como o NF- κ B, COX-2, por diversas vias sendo uma delas a inibição da STAT3 (BURTON et al., 2015; ESPOSITO et al., 2014; JEONG et al., 2013; PEIFFER et al., 2014; YOSHIMOTO et al., 1999). Yoshimoto *et al.* (1999) comprovaram a capacidade anti-mutagênica das antocianinas ao inibir a mutação reversa de células normais induzidas por composto mutagênico.

Os polifenóis desempenham efeitos anti-oxidantes, reduzindo o desequilíbrio e danos causados pelo estresse oxidativo, e efeitos pró-oxidantes, dado a sua citotoxicidade em células cancerígenas (GÀO; SCHÖTTKER, 2017). Nos estágios iniciais do desenvolvimento do câncer as antocianinas podem induzir a apoptose de células tumorais através das mitocôndrias e dos receptores de morte celular (LIN et al., 2017). No câncer de estômago as antocianinas provenientes da amoreira promoveram a apoptose das células cancerígenas externamente através dos receptores p38/Fas/FasL/Caspase-8. Já nas células de leucemia humana (HL-60), a delfinidina (um tipo de antocianina) promoveu a ativação da via dos receptores p38-FasL e da proteína pró-apoptose Bid (da família de proteínas Bcl-2), levando a apoptose destas células através da via dependente de caspase (CHANG et al., 2005; CHAREPALLI et al., 2015; HUANG et al., 2011). No câncer de próstata, antocianinas extraídas de batatas podem levar mitocôndrias a ativar a via apoptótica através da via independente de caspase em células LNCap e PC-3 (LIU et al., 2016; REDDIVARI et al., 2007). As antocianinas também podem inibir a angiogênese tumoral ao reduzir a expressão do fator indutor de hipóxia (HIF1) e de VEGF em células tumorais de esôfago (F344) (WANG et al., 2009).

A administração oral de antocianinas em ratos Sprague-Dawley reduziu a incidências de AR, 5 α -redutase e PCNA no tecido prostático hiperplásico (CHOI et al., 2019). Estudos com gossipol, um polifenol presente em sementes de algodão, demonstraram sua capacidade em inibir a produção de androstenediol, um metabólito da DHT, ao inibir a atuação da 5 α -redutase (SRD5A1) e 3 α -hidroxiesteróide desidrogenase (AKR1C14)(CAO et al., 2019).

As antocianinas foram capazes de induzir a apoptose in vitro de células cancerígenas de próstata humana através da ativação das caspases (BIN HAFEEZ et al., 2008) e da redução de expressão da ciclina D1, impedindo as células LNCaP entrarem na fase G1 do ciclo celular, reduzindo a proliferação celular (LONG et al., 2013). Sabe-se que as antocianinas possuem maior afinidade com o estradiol, estrógeno circulante, do que com o receptor de estrógeno *alpha*. Estudos demonstram as antocianinas como fitoestrógenos, moléculas não estrogênicas capazes de promover ativação dos receptores de estrógeno, de maneira estrógeno dependente (CHALOPIN et al., 2010; NANASHIMA et al., 2015) e independente de estrógenos, via AMP-Quinase (PARK et al., 2015).

O resveratrol, um fitoestrógeno, presente na casca de uvas e no vinho tinto, apresenta efeitos quimiopreventivos e quimioterapêuticos em tumores estrógeno-dependentes, como o câncer de mama (LE CORRE et al., 2005; MIKSITS et al., 2009). Estudos células de adenoma hipofisário (GH3) mostraram que a administração de resveratrol foi capaz de induzir a apoptose e suprimir a proliferação celular e promover a parada do ciclo celular na fase G1 pela redução da expressão da ciclina D3, semelhante às antocianinas. Neste experimento, os níveis de prolactina tecidual foram reduzidos após o tratamento, de maneira dose-dependente (WANG et al., 2012a).

Jamun (*Syzygium cumini*), uma baga encontrada na Índia e outros países asiáticos, contém antocianinas incluindo glicosídeos de delphinina, malvidina, cianidina, petunidina, peonidina e quantidades significantes de ácido elágico (AQIL et al., 2012; AYYANAR; SUBASH-BABU; IGNACIMUTHU, 2013). A polpa de Jamun é conhecida pelos seus efeitos antiproliferativos e induzir a apoptose em células de câncer de mama (LI et al., 2009). Em ratas ACI que foram tratadas com o extrato de Jamun e estradiol, houve redução nos níveis de prolactina. Apesar disto, não é claro se o extrato de Jamun age diretamente nos níveis de prolactina ou se estes níveis foram reduzidos devido à redução nos níveis circulantes de estrógeno provocados pelo consumo do extrato.

No câncer de próstata, os polifenóis tem efeito quimiopreventivo dado sua capacidade plástica em atuar nas vias anti e pró-oxidante, modulação dos receptores

andrógenos (inibindo ou expressando sua ativação), indução a parada do ciclo celular, apoptose celular, inibição da angiogênese e metástase (COSTEA et al., 2019).

Dentre os polifenóis naturais, o ácido elágico é encontrado em frutas e vegetais, possui propriedade antiinflamatórias, antioxidantes e anticarcinogênicas como a inibição de formação e crescimento de tumores *in vitro* e *in vivo* (SARTIPPOUR et al., 2008; SEERAM et al., 2005, 2007; UMESALMA; SUDHANDIRAN, 2011). A avaliação da composição do extrato da casca da jabuticaba (ECJ) utilizada neste trabalho identificou a presença de ácido elágico em 19,6mg/mL de extrato, sendo o segundo composto bioativo de maior incidência na composição do ECJ, depois das antocianinas (LAMAS et al., 2018).

Wang *et al.* (2012) reportaram a atuação do ácido elágico na redução da angiogênese via receptor de VEGF (VEGFR-2) no câncer de mama suprimindo a migração e a formação de vasos. A administração do ácido elágico em linhagens celulares de câncer de próstata (LnCAP) promoveu a redução da angiogênese e de outros fatores de crescimento e interleucinas (VEGF, FGF, HGF E IL-15) *in vitro* (VANELLA et al., 2013). Também, atuou como potencial supressor da motilidade e invasividade de células PC3 ao reduzir a secreção de metaloproteínas (MMP-2) e a atividade proteolítica da colagenase/gelatinase (CECI et al., 2018).

Nas células o ácido elágico é capaz de interferir e modular o ciclo celular, podendo gerar apoptose, a expressão proteica e genética, além de interferir em vias que regulam a viabilidade celular. No modelo transgênico para adenocarcinoma de próstata de ratos (TRAP), o ácido elágico suprimiu a progressão da carcinogênese e induziu apoptose via caspase-3 (CECI et al., 2018).

Estudos com o chá verde mostraram sua capacidade em inibir o desenvolvimento e crescimento de tumores, reduzir a angiogênese, a invasão e a metástase de tumores. Acredita-se que os polifenóis presentes sejam responsáveis pela atuação do chá verde na carcinogênese (GULLETT et al., 2010). O composto fenólico presente em maior quantidade no chá verde é a epigalocatequina-galato (EGCG) e experimentos com suplementação deste composto mostraram sua capacidade em

reduzir os níveis de VEGF no câncer de próstata e inibir a angiogênese via VEGF. Também, EGCG é conhecido por inibir a expressão de fatores como o FGF e VACM-1 (molécula adesiva) (WAHLE et al., 2010)

Os dados do presente estudo indicam que o consumo do ECJ foi benéfico, diminuindo a proliferação e desenvolvimento das lesões neoplásicas e a severidade das mesmas no lobo anterior da próstata. Também, exerceu reparo tecidual onde havia maior desbalanço, causado pelo consumo da dieta hiperlipídica. Por fim, o extrato da casa da jabuticaba é indicado para consumo de indivíduos que possuem hábitos de vida que poderão ocasionar inflamações, desbalanço hormonal e lesões que poderão promover o desenvolvimento do câncer de próstata.

O extrato da casca da jabuticaba foi capaz de reduzir os efeitos malignos causados pelo consumo da dieta hiperlipídica no tecido prostático. O extrato atuou na via dos receptores de andrógenos e de prolactina, mas não promoveu alterações sobre os níveis de ER α , sugerindo que sua atuação não se dá através da via estrogênica no início do desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas. Entretanto, o extrato foi capaz de conservar o tecido prostático saudável, mantendo a relação entre os receptores androgênicos e estrogênicos semelhante ao controle que não recebeu dieta hiperlipídica ou o extrato, fator essencial para o início do desenvolvimento da neoplasia. O extrato da casca da Jabuticaba com seus componentes bioativos e suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-tumorgênicas foram capazes de reduzir a angiogênese e alterações estromais causadas pelo envelhecimento e o consumo da dieta hiperlipídica no estroma prostático.

7. CONCLUSÕES

7.1. Conclusões Gerais

O extrato da casca da jabuticaba tem forte atividade de reparo tecidual.

A administração do extrato da casca da Jabuticaba foi benéfica para o câncer de próstata ao estabilizar fatores pró-oncogênicos no tecido prostático: Minimizou o desbalanço da relação entre os hormônios androgênicos e estrogênicos, fator essencial para o início do desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas; Reduziu o índice proliferativo e, conseqüentemente, a progressão de processos proliferativos no lobo anterior da próstata; minimizou os efeitos nocivos da dieta hiperlipídica no microambiente prostático, retardando o início de processos angiogênicos e modificações celulares que promoveriam o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas.

O extrato da casca da jabuticaba teve sua característica de reparação tecidual intensificada quando interagiu com tecido prostático que sofreu drásticas alterações moleculares e morfológicas.

7.2. Conclusões Específicas

A dieta hiperlipídica foi fator prejudicial para o lobo anterior da próstata dos camundongos geneticamente modificados, levando a aceleração das lesões proliferativas com conseqüente progressão do adenocarcinoma do lobo anterior da próstata.

No lobo anterior da próstata dos camundongos TRAMP, o avanço das lesões pré-neoplásicas foi caracterizado com o aumento da idade e está relacionado com o aumento dos processos proliferativos.

A administração do extrato de Jabuticaba foi benéfica, minimizando a progressão de processos proliferativos no lobo anterior da próstata, tanto nos camundongos que receberam a dieta hiperlipídica, como nos animais que receberam a dieta normolipídica.

A dieta hiperlipídica, através da influência na via de sinalização androgênica e de prolactina, aumentou os processos proliferativos e de crescimento promovidos por estes hormônios.

O extrato da casca da jabuticaba não promoveu alterações sobre os níveis de ER α , sugerindo que sua atuação na próstata não se dá através da via estrogênica no início do desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas, sendo necessário outras análises sobre a atuação do extrato nesta via hormonal.

As lesões pré-neoplásicas causadas pelo envelhecimento em processos proliferativos de lenta progressão não foram suficientes para dar início a angiogênese, promover alterações estromais e na distribuição de α -actina.

A angiogênese, assim como as alterações estromais, têm início com a incidência de lesões pré-neoplásicas, influenciadas pelo tecido adiposo, que irão desencadear no desenvolvimento do adenocarcinoma de próstata e precisam de respostas plásticas do estroma prostático.

O extrato da casca da jabuticaba atenuou os efeitos nocivos da dieta hiperlipídica no estroma, impedindo a angiogênese e alterações estromais em resposta das lesões prostáticas proliferativas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE-SHEN, C.; SHEN, M. M. FGF Signaling in Prostate Tumorigenesis-New Insights into Epithelial-Stromal Interactions *Cancer Cell*, 6 dez. 2007.

ABE, L. T. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Vitis labrusca* and *Vitis vinifera* cultivars. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, p. 394–400, 2007.

ALLOTT, E. H.; MASKO, E. M.; FREEDLAND, S. J. Obesity and prostate cancer: Weighing the evidence *European Urology*, maio 2013.

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

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts and Figures 2019. Atlanta: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2019/cancer-facts-and-figures-2019.pdf>>. Acesso em: 21 out. 2019.

AQIL, F. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry). *Nutrition and Cancer*, v. 64, n. 3, p. 428–438, 1 abr. 2012.

ARSLAN, E.; ATILGAN, H.; YAVAŞOĞLU, I. The prevalence of *Helicobacter pylori* in obese subjects. *European Journal of Internal Medicine*, v. 20, n. 7, p. 695–697, nov. 2009.

AUMÜLLER, G.; ADLER, G. Experimental studies of apocrine secretion in the dorsal prostate epithelium of the rat. *Cell and Tissue Research*, v. 198, n. 1, p. 145–158, 1979.

AUMÜLLER, G.; SEITZ, J. Protein Secretion and Secretory Processes in Male Accessory Sex Glands. *International Review of Cytology*, v. 121, n. C, p. 127–231, 1990.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P.; IGNACIMUTHU, S. *Syzygium cumini* (L.) Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: folk medicinal and pharmacological evidences. *Complementary therapies in medicine*, v. 21, n. 3, p. 232–43, jun. 2013.

BANERJEE, P. P.; BANERJEE, S.; BROWN, T. R. Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the brown Norway rat prostate. *Endocrinology*, v. 142, n. 9, p. 4066–75, set. 2001.

BARRON, D. A.; ROWLEY, D. R. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocrine-Related Cancer*, v. 19, n. 6, p. 187–204, 2012.

BARTKE, A. Prolactin in the male: 25 Years later. *Journal of Andrology*, v. 25, n. 5, p. 661–666, 2004.

BASEN-ENGQUIST, K.; CHANG, M. Obesity and cancer risk: Recent review and evidence *Current Oncology Reports*, fev. 2011.

BAULIEU, E. E. Androgens and aging men. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Anais...30 dez. 2002

BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch *Nature Reviews Cancer*, jun. 2003.

BERMAN-BOOTY, L. D. et al. A Review of the Existing Grading Schemes and a Proposal for a Modified Grading Scheme for Prostatic Lesions in TRAMP Mice *Toxicologic Pathology*, 2012.

BHASKARAN, K. et al. Body-mass index and risk of 22 specific cancers: A population-based cohort study of 5·24 million UK adults. *The Lancet*, v. 384, n. 9945, p. 755–765, 2014.

BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, v. 432, p. 332–337, 2004.

BIANCHINI, F.; KAAKS, R.; VAINIO, H. Overweight, obesity, and cancer risk *Lancet Oncology* *Lancet Publishing Group*, , 2002.

BIN HAFEEZ, B. et al. Delphinidin, a dietary anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables: a new weapon to blunt prostate cancer growth. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, v. 7, n. 21, p. 3320–6, 1 nov. 2008.

BIRBACH, A. et al. Persistent Inflammation Leads to Proliferative Neoplasia and Loss of Smooth Muscle Cells in a Prostate Tumor Model. *Neoplasia*, v. 13, n. 8, p. 692-IN17, 2011.

BLESSO, C. N. Dietary Anthocyanins and Human Health. *Nutrients*, v. 11, n. 9, p. 2107, 5 set. 2019.

BONKHOFF, H. et al. Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostatic lesions. *American Journal of Pathology*, v. 155, n. 2, p. 641–647, 1999.

BONKHOFF, H. Estrogen receptor signaling in prostate cancer: Implications for carcinogenesis and tumor progression *Prostate* *John Wiley and Sons Inc.*, , 1 jan. 2018.

BORST, S. E.; MULLIGAN, T. Testosterone replacement therapy for older men. *Clinical interventions in aging*, 2007.

BOSLAND, M. C. The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 2000.

BOWEN-FORBES, C. S.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 23, n. 6, p. 554–560, set. 2010.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BRINKMANN, A. O. et al. Mechanisms of androgen receptor activation and function. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, v. 69, n. 1–6, p. 307–13, 1999.

BROWN, L. M. et al. Metabolic impact of sex hormones on obesity *Brain Research*, 2 set. 2010.

BRUCHOVSKY, N.; WILSON, J. D. The conversion of testosterone to 5-alpha-androstan-17-beta-ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro. *The Journal of biological chemistry*, v. 243, n. 8, p. 2012–21, 25 abr. 1968.

BULL, J. H. et al. Identification of potential diagnostic markers of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia using cDNA microarray. *Culture*, v. 84, n. February, p. 1512–1519, 2001.

BURTON, L. J. et al. Muscadine grape skin extract can antagonize Snail-cathepsin L-mediated invasion, migration and osteoclastogenesis in prostate and breast cancer cells. *Carcinogenesis*, v. 36, n. 9, p. 1019–27, set. 2015.

BUTLAND, B. et al. Tackling Obesities: Future Choices - Project Report. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.foresight.gov.uk>. Acesso em: 21 out. 2019.

CAMPISI, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: Good citizens, bad neighbors. *Cell*, v. 120, n. 4, p. 513–522, 2005.

CAO, S. et al. Gossypol inhibits 5 α -reductase 1 and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase: Its possible use for the treatment of prostate cancer. *Fitoterapia*, v. 133, p. 102–108, 1 mar. 2019.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases *Nature*, 14 set. 2000.

CARVALHO-SALLES, A. B.; TAJARA, E. H. Fatores hormonais e genéticos na próstata normal e neoplásica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 43, n. 3, p. 177–185, jun. 1999.

CECI, C. et al. Experimental evidence of the antitumor, antimetastatic and antiangiogenic activity of ellagic acid. *Nutrients* MDPI AG, , 14 nov. 2018.

CHALOPIN, M. et al. Estrogen receptor alpha as a key target of red wine polyphenols action on the endothelium. *PLoS one*, v. 5, n. 1, p. e8554, 1 jan. 2010.

CHAN, J. M. et al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: A prospective study. *Science*, v. 279, n. 5350, p. 563–566, 23 jan. 1998.

CHANG, Y. C. et al. Hibiscus anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 205, n. 3, p. 201–212, 15 jun. 2005.

CHAREPALLI, V. et al. Anthocyanin-containing purple-fleshed potatoes suppress colon tumorigenesis via elimination of colon cancer stem cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 26, n. 12, p. 1641–1649, 1 dez. 2015.

CHIAVEROTTI, T. et al. Dissociation of epithelial and neuroendocrine carcinoma lineages in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model of prostate cancer. *American Journal of Pathology*, v. 172, n. 1, p. 236–246, 2008.

CHO, H. J. 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.

CHOI, Y.-J. et al. In Vivo Effects of Polymerized Anthocyanin from Grape Skin on Benign Prostatic Hyperplasia. *Nutrients*, v. 11, n. 10, 14 out. 2019.

CHRISTOFOROU, P.; CHRISTOPOULOS, P. F.; KOUTSILIERIS, M. The role of estrogen receptor β in prostate cancer. *Molecular Medicine*, v. 20, n. JULY-DECEMBER 2014, p. 427–434, 2014.

CHUNG, L. W. K. et al. Molecular Insights Into Prostate Cancer Progression: the Missing Link of Tumor Microenvironment. *The Journal of Urology*, v. 173, n. 1, p. 10–20, 2005.

COHEN, P. G. Obesity in men: the hypogonadal-estrogen receptor relationship and its effect on glucose homeostasis. *Medical hypotheses*, v. 70, n. 2, p. 358–60, 2008.

COLLINS, A. T.; MAITLAND, N. J. Prostate cancer stem cells. *European Journal of Cancer*, v. 42, n. 9, p. 1213–1218, 2006.

COLOMBEL, M. C.; BUTTYAN, R. Hormonal control of apoptosis: the rat prostate gland as a model system. . *Methods in Cell Biology*, v. 46, p. 369–385, 1995.

CORDEIRO, R. S. et al. Androgen receptor in the Mongolian gerbil ventral prostate: Evaluation during different phases of postnatal development and following androgen blockage. *Micron*, v. 39, n. 8, p. 1312–1324, 2008.

CORNELL, R. J. et al. Neuroepithelial interactions in prostate cancer are enhanced in the presence of prostatic stroma. *Urology*, v. 61, n. 4, p. 870–875, 2003.

COSTANZA, B. et al. Stromal Modulators of TGF- β in Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, v. 6, n. 1, p. 7, 6 jan. 2017.

COSTEA, T. et al. Molecular mechanisms and bioavailability of polyphenols in prostate cancer *International Journal of Molecular Sciences MDPI AG*, , 1 mar. 2019.

COSTELLO, L. C.; FRANKLIN, R. B. Effect of Prolactin on the Prostate *The Prostate*. [s.l: s.n.].

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents †. *Chemal Review*, v. 109, p. 3012–3043, 2009.

CRUZ-BERMÚDEZ, A. et al. Cancer-associated fibroblasts modify lung cancer metabolism involving ROS and TGF- β signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 130, p. 163–173, 1 jan. 2019.

CULIG, Z. et al. Androgen Receptor Activation in Prostatic Tumor Cell Lines by Insulin-like Growth Factor-I, Keratinocyte Growth Factor, and Epidermal Growth Factor. *Cancer Research*, v. 54, n. 20, p. 5474–5478, 15 out. 1994.

CULIG, Z. Resistance to anti-hormonal therapy in prostate cancer *Memo - Magazine of European Medical Oncology Springer-Verlag Wien*, , 1 jun. 2019.

CUNHA, G. R.; MATRISIAN, L. M. It's not my fault, blame it on my microenvironment. *Differentiation*, v. 70, n. 9–10, p. 469–472, 2002.

DA SILVA, R. F. et al. Nintedanib antiangiogenic inhibitor effectiveness in delaying adenocarcinoma progression in Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP). *Journal of Biomedical Science*, v. 24, n. 1, 12 maio 2017.

DA SILVA, R. F. et al. Antiangiogenic therapy with Nintedanib affects hypoxia, angiogenesis and apoptosis in the ventral prostate of TRAMP animals. *Cell and Tissue Research*, 31 ago. 2019.

DAGVADORJ, A. et al. Autocrine prolactin promotes prostate cancer cell growth via Janus kinase-2-signal transducer and activator of transcription-5a/b signaling pathway. *Endocrinology*, v. 148, n. 7, p. 3089–3101, 2007.

DAVALOS, A. R. et al. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 29, n. 2, p. 273–283, 2010.

DE LA ROSA, L. A. et al. Phenolic Compounds. In: *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 253–271.

DE LIMA, A. J. B. et al. Caracterização química do fruto jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, v. 58, n. 4, p. 416–421, 2008.

DE MARZO, A. M. et al. Proliferative Inflammatory Atrophy of the Prostate. *The American Journal of Pathology*, v. 155, n. 6, p. 1985–1992, 1999.

DEFURIA, J. et al. Dietary blueberry attenuates whole-body insulin resistance in high fat-fed mice by reducing adipocyte death and its inflammatory sequelae. *The Journal of nutrition*, v. 139, n. 8, p. 1510–6, 2009.

DENIS, L. J.; GRIFFITHS, K. Endocrine treatment in prostate cancer *Seminars in Surgical Oncology*, jan. 2000.

DIGIOVANNI, J. et al. Deregulated expression of insulin-like growth factor 1 in prostate epithelium leads to neoplasia in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 7, p. 3455–3460, 28 mar. 2000.

DOBBS, R. W. et al. Estrogens and prostate cancer *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* Nature Publishing Group, , 1 maio 2019.

DOLL, J. A. et al. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate. *Prostate*, v. 49, n. 4, p. 293–305, 2001.

DONADIO, Luis C. Jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). Funep, 2000.

DRAGANO, N. R. V. et al. Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high-fat-fed mice. *British Journal of Nutrition*, v. 110, n. 3, p. 447–455, 14 ago. 2013.

EKMAN, P. The prostate as an endocrine organ: Androgens and estrogens. *The Prostate*, v. 45, n. S10, p. 14–18, 1 jan. 2000.

- EL-ALFY, M. et al. Localization of type 5 17β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3β -hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry. *Endocrinology*, v. 140, n. 3, p. 1481–1491, 1999.
- ELLEM, S. J.; RISBRIDGER, G. P. Aromatase and regulating the estrogen: Androgen ratio in the prostate gland. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Anais...Elsevier Ltd, 28 fev. 2010
- ESPOSITO, D. et al. Inhibitory effects of wild blueberry anthocyanins and other flavonoids on biomarkers of acute and chronic inflammation in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 62, n. 29, p. 7022–8, 23 jul. 2014.
- FELDMAN, B. J.; FELDMAN, D. The development of Androgen-Independent Prostate Cancer. *Nature Reviews - Cancer*, v. 1, p. 34–41, 2001.
- FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors *Nature Medicine*, 1 jun. 2003.
- FONG, G. H. et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium *Nature*, 6 jul. 1995.
- FONTANA, A. et al. Modulation of the immune response by transforming growth factor beta. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 99, n. 1, p. 1–7, 1992.
- FORSYTHE, L. K.; WALLACE, J. M. W.; LIVINGSTONE, M. B. E. Obesity and inflammation: The effects of weight loss. *Nutrition Research Reviews*, v. 21, n. 2, p. 117–133, dez. 2008.
- FRIEDMAN, J. M. Obesity: Causes and control of excess body fat *Nature*, 21 maio 2009.
- FRYCZKOWSKI, M. et al. Circulating Levels of Omentin, Leptin, VEGF, and HGF and Their Clinical Relevance with PSA Marker in Prostate Cancer. *Disease Markers*, v. 2018, 2018.
- FUJITA, K. et al. Obesity, Inflammation, and Prostate Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, v. 8, n. 2, p. 201, 6 fev. 2019.
- FUJITA, K.; NONOMURA, N. Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *The World Journal of Men's Health*, v. 37, n. 3, p. 288, 2019.
- GABBIANI, G.; MAJNO, G. Dupuytren ' s Contracture : Fibroblast Contraction ? 1972.
- GANAPATHY, S. et al. Resveratrol enhances antitumor activity of TRAIL in prostate cancer xenografts through activation of FOXO transcription factor. *PLoS ONE*, v. 5, n. 12, 2010.

- GÀO, X.; SCHÖTTKER, B. Reduction-oxidation pathways involved in cancer development: a systematic review of literature reviews. *Oncotarget*, v. 8, n. 31, p. 51888–51906, 1 ago. 2017.
- GARCIA-RIO, F. et al. Obesity and Asthma: Key Clinical Questions. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, v. 29, n. 4, p. 262–271, 2 abr. 2019.
- GÉRARD, C.; BROWN, K. A. Obesity and breast cancer – Role of estrogens and the molecular underpinnings of aromatase regulation in breast adipose tissue *Molecular and Cellular Endocrinology* Elsevier Ireland Ltd, , 5 maio 2018.
- GIBELLINI, L. et al. Natural Compounds Modulating Mitochondrial Functions Evidence-based Complementary and Alternative Medicine Hindawi Limited, , 2015.
- GIMBRONE, M. A. et al. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *Journal of Experimental Medicine*, v. 136, n. 2, p. 261–276, 1 ago. 1972.
- GINGRICH, J. R. et al. Advances in Brief Metastatic Prostate Cancer in a Transgenic Mouse1. p. 4096–4103, 1996.
- GINGRICH, J. R. et al. Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, v. 2, n. 2, p. 70–75, 1999.
- GOENA, M. et al. Effect of the raw legume *Vicia ervilia* on muscle and liver protein metabolism in growing rats. *Revista española de fisiología*, v. 45 Suppl, p. 55–9, 1989.
- GREENBERG, N. M. et al. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Medical Sciences*, v. 92, n. April, p. 3439–3443, 1995.
- GREENBERG, N. M. Transgenic models for prostate cancer research. *Urologic oncology*, v. 2, n. 4, p. 119–22, jul. 1996.
- GREENFIELD, J. R.; CAMPBELL, L. V. Relationship between inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes: “cause or effect”? *Current diabetes reviews*, v. 2, n. 2, p. 195–211, 2006.
- GRIFFITHS, K.; MORTON, M. S.; NICHOLSON, R. I. Androgens, androgen receptors, antiandrogens and the treatment of prostate cancer. *European urology*, v. 32 Suppl 3, p. 24–40, 1997.
- GROSSO, G. et al. Health risk factors associated with meat, fruit and vegetable consumption in cohort studies: A comprehensive meta-analysis. *PLoS ONE*, v. 12, n. 8, 1 ago. 2017.

- GULLETT, N. P. et al. Cancer prevention with natural compounds. *Seminars in Oncology*, v. 37, n. 3, p. 258–281, 2010.
- GURNANI, M.; BIRKEN, C.; HAMILTON, J. Childhood Obesity: Causes, Consequences, and Management *Pediatric Clinics of North America* W.B. Saunders, , 1 ago. 2015.
- HÄRKÖNEN, P. Paracrine prolactin may cause prostatic problems. *Endocrinology*. Anais...1 jun. 2003
- HÄRKÖNEN, P. L.; MÄKELÄ, S. I. Role of estrogens in development of prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2004.
- HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 1, n. 1, p. 163–187, 2010.
- HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen receptor (AR) coregulators: An overview *Endocrine Reviews* Endocrine Society, , 2002.
- HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen receptor in prostate cancer *Endocrine Reviews*, abr. 2004.
- HETZL, A. C. et al. Fibroblast growth factor, estrogen, and prolactin receptor features in different grades of prostatic adenocarcinoma in elderly men. *Microscopy Research and Technique*, v. 76, n. 3, p. 321–330, mar. 2013.
- HETZL, A. C. et al. Prostatic microenvironment in senescence: Fibroblastic growth factors x hormonal imbalance. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 141, n. 5, p. 531–542, 2014.
- HETZL, A. C. et al. Prolactin, EGFR, vimentin and α -actin profiles in elderly rat prostate subjected to steroid hormonal imbalance. *Tissue and Cell*, v. 48, n. 3, p. 189–196, 1 jun. 2016.
- HINZ, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair *Journal of Investigative Dermatology* Nature Publishing Group, , 2007.
- HO, C.-T.; RAFI, M.; GHAI, G. Substâncias bioativas: Nutracêuticas e tóxicas. 2010.
- HOBISCH, A. et al. Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor. *Cancer Research*, v. 58, n. 20, p. 4640–4645, 15 out. 1998.

HU, M. B. et al. High-fat diet-induced adipokine and cytokine alterations promote the progression of prostate cancer in vivo and in vitro. *Oncology Letters*, v. 15, n. 2, p. 1607–1615, 2018.

HUANG, H. P. et al. Anthocyanin-rich Mulberry extract inhibit the gastric cancer cell growth in vitro and xenograft mice by inducing signals of p38/p53 and c-jun. *Food Chemistry*, v. 129, n. 4, p. 1703–1709, 15 dez. 2011.

HUBERT, H. B. Obesity as an Independent Risk Factor for Cardiovascular Disease : A 26-year Follow-up of Participants in the Framingham Heart Study. *American Heart Association Journal*, v. 67, n. 5, p. 968–976, 1982.

HUGGINS, C.; SCOTT, W. W.; HEINEN, J. H. CHEMICAL COMPOSITION OF HUMAN SEMEN AND OF THE SECRETIONS OF THE PROSTATE AND SEMINAL VESICLES. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, v. 136, n. 3, p. 467–473, 1 maio 1942.

HURWITZ, A. A. et al. The TRAMP Mouse as a Model for Prostate Cancer. *Current Protocols in Immunology*, p. 1–23, 2001.

HUSS, W. J. et al. Angiogenesis and Prostate Cancer : Identification of A Molecular Progression Switch Angiogenesis and Prostate Cancer : Identification of A Molecular Progression Switch 1. p. 2736–2743, 2001.

HUSS, W. J. et al. Differential Expression of Specific FGFLigand and Receptor Isoforms During Angiogenesis Associated With Prostate Cancer Progression. *The Prostate*, v. 54, p. 8–16, 2003.

HUSS, W. J.; BARRIOS, R. J.; FOSTER, B. A. Differential Expression of Specific FGF Ligand and Receptor Isoforms During Angiogenesis Associated With Prostate Cancer Progression. v. 16, n. November 2001, p. 8–16, 2003.

IMAMOV, O. et al. Estrogen Receptor beta in Health and Disease¹. *Biology of Reproduction*, v. 73, n. 5, p. 866–871, 1 nov. 2005.

INGELMO, I. et al. Effect of prolactin and bromocriptine on the population of prostate neuroendocrine cells from intact and cyproterone acetate-treated rats: Stereological and immunohistochemical study. *Anatomical Record*, v. 290, n. 7, p. 855–861, 2007.

ISHII, K. et al. Abstract 2026: Loss of fibroblasts-dependent androgen receptor activation in prostate cancer cells develops castration-resistant prostate cancer. *Tumor Biology*. *Anais...American Association for Cancer Research*, 1 jul. 2019 Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1538-7445.AM2019-2026>>. Acesso em: 24 out. 2019

- JASTREBOFF, A. M. et al. Obesity as a Disease: The Obesity Society 2018 Position Statement. *Obesity*, v. 27, n. 1, p. 7–9, 1 jan. 2019.
- JEONG, J.-W. et al. Anthocyanins downregulate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglial cells by suppressing the NF- κ B and Akt/MAPKs signaling pathways. *International journal of molecular sciences*, v. 14, n. 1, p. 1502–15, 14 jan. 2013.
- JESIK, C. J.; HOLLAND, J. M.; LEE, C. An anatomic and histologic study of the rat prostate. *The Prostate*, v. 3, p. 81–97, 1982.
- JEYARAJ, D. A. et al. Effects of long-term administration of androgens and estrogen on rhesus monkey prostate: possible induction of benign prostatic hyperplasia. *Journal of andrology*, v. 21, n. 6, p. 833–841, 2000.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical Journal*, v. 11, n. 4, p. 447–455, 1979.
- KALT, W. et al. Recent Research on the Health Benefits of Blueberries and Their Anthocyanins. *Advances in Nutrition*, 22 jul. 2019.
- KANG, I.; LEE, Y.; LEE, M. Anthocyanins: What They Are and How They Relate to Obesity Prevention. In: *Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity*. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 409–430.
- KAPLAN-LEFKO, P. J. et al. Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model. *Prostate*, v. 55, n. 3, p. 219–237, 2003.
- KARKKAINEN, M. J.; MÄKINEN, T.; ALITALO, K. Lymphatic endothelium: A new frontier of metastasis research *Nature Cell Biology*, 2002.
- KIDO, L. A. et al. Anti-inflammatory therapies in TRAMP mice: Delay in PCa progression. *Endocrine-Related Cancer*, v. 23, n. 4, p. 235–250, 1 abr. 2016.
- KIDO, L. A. et al. Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP) model: A good alternative to study PCa progression and chemoprevention approaches *Life Sciences*, 2019.
- KINDBLOM, J. et al. Prostate hyperplasia in a transgenic mouse with prostate-specific expression of prolactin. *Endocrinology*. Anais...1 jun. 2003
- KONG, J. M. et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, v. 64, n. 5, p. 923–933, 2003.

- KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. *Nature*, v. 404, n. 6778, p. 635–643, 2000.
- KOWALSKA, K.; PIASTOWSKA-CIESIELSKA, A. W. Oestrogens and oestrogen receptors in prostate cancer *SpringerPlusSpringerOpen*, , 1 dez. 2016.
- KREIS, T.; VALE, R. *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins*. [s.l.: s.n.].
- LAI, K. P. et al. Loss of stromal androgen receptor leads to suppressed prostate tumourigenesis via modulation of pro-inflammatory cytokines/chemokines. *EMBO Molecular Medicine*, v. 4, n. 8, p. 791–807, ago. 2012.
- LAMAS, C. A. et al. Jaboticaba extract prevents prediabetes and liver steatosis in high-fat-fed aging mice. *Journal of Functional Foods*, v. 47, p. 434–446, 1 ago. 2018.
- LANGLEY, S. E. M.; NOBES, J. P. Prostate cancer and the metabolic syndrome. In: *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. [s.l.] Springer-Verlag London Ltd, 2013. p. 107–114.
- LATIL, A. et al. Evaluation of androgen, estrogen (er α and er β), and progesterone receptor expression in human prostate cancer by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Cancer Research*, v. 61, n. 5, p. 1919–1926, 1 mar. 2001.
- LE CORRE, L. et al. Resveratrol and breast cancer chemoprevention: Molecular mechanisms *Molecular Nutrition and Food Research*, maio 2005.
- LEAV, I. et al. Androgen-supported estrogen-enhanced epithelial proliferation in the prostates of intact noble rats. *The Prostate*, v. 15, n. 1, p. 23–40, 1989.
- LEAV, I. et al. Androgen receptor expression in prostatic dysplasia (prostatic intraepithelial neoplasia) in the human prostate: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Prostate*, v. 29, n. 3, p. 137–145, 1996.
- LEAV, I. et al. Comparative studies of the estrogen receptors β and α and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *American Journal of Pathology*, v. 159, n. 1, p. 79–92, 2001.
- LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, set. 2011.
- LEE, Y. M. et al. Dietary anthocyanins against obesity and inflammation. *Nutrients*, v. 9, n. 10, p. 1–15, 2017.

- LEITE-LEGATTI, A. V. et al. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. *Food Research International*, v. 49, n. 1, p. 596–603, 2012.
- LEITE, A. V. et al. Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 6, p. 2277–2283, 2011.
- LENQUISTE, S. A. et al. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. *Food Research International*, v. 49, n. 1, p. 153–160, nov. 2012.
- LENQUISTE, S. A. et al. Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract shows in vitro and in vivo antioxidant properties in obesity model. *Food Research International*, 2015.
- LEUNG, D. et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, v. 246, n. 4935, p. 1306–1309, 1989.
- LI, D. et al. Purified Anthocyanin Supplementation Reduces Dyslipidemia, Enhances Antioxidant Capacity, and Prevents Insulin Resistance in Diabetic Patients. *The Journal of Nutrition*, v. 145, n. 4, p. 742–748, 1 abr. 2015.
- LI, L. et al. *Eugenia jambolana* Lam. berry extract inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer but not non-tumorigenic breast cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 3, p. 826–831, 11 fev. 2009.
- LIN, B. W. et al. Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer *British Journal of Pharmacology* John Wiley and Sons Inc., , 2017.
- LIN, C. Q.; BISSELL, M. J. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *The FASEB Journal*, v. 7, n. 9, p. 737–743, jun. 1993.
- LIN, Y.; WANG, F. FGF signalling in prostate development, tissue homeostasis and tumorigenesis. *Biosci. Rep*, 2010.
- LIU, J. et al. Cyanidin 3-O- β -Glucoside Ameliorates Ethanol-Induced Acute Liver Injury by Attenuating Oxidative Stress and Apoptosis: The Role of SIRT1/FOXO1 Signaling. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 40, n. 3, p. 457–466, 1 mar. 2016.
- LONG, N. et al. Purple corn color inhibition of prostate carcinogenesis by targeting cell growth pathways. *Cancer Science*, v. 104, n. 3, p. 298–303, mar. 2013.
- LU, J. et al. Novel angiogenesis inhibitory activity in cinnamon extract blocks VEGFR2 kinase and downstream signaling. *Carcinogenesis*, v. 31, n. 3, p. 481–488, mar. 2010.

MACMAHON, S. et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: Collaborative analyses of 57 prospective studies. *The Lancet*, v. 373, n. 9669, p. 1083–1096, 28 mar. 2009.

MADMOLI, M. et al. Communication between body mass index and the risk of obesity-related cancer: A 5-year study on patients with cancer. *Medical Science*, v. 23, n. 95, p. 69–74, 2019.

MARKER, P. C. et al. *Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development* Developmental Biology Academic Press Inc., , 15 jan. 2003.

MARÓSTICA, M. R., Quitete, V. H. A. C., Lamas, C. A., Lenquiste, S. A., Reyes, F. G., Braga, P. A. C., & Baseggio, A. M. (2017) Pedido de Patente Privilégio de Invenção: Composição compreendendo extrato da casca da jabuticaba, e usos da mesma, depositado no INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL INPI, em 17.03.17, sob nº BR 1020170054624.

MATEUS, P. A. M. et al. Association of anti-inflammatory and antiangiogenic therapies negatively influences prostate cancer progression in TRAMP mice. *Prostate*, v. 79, n. 5, p. 515–535, 1 abr. 2019.

MATTOS, J. R. *Frutas nativas do Brasil: jabuticabeiras*. São Paulo, Nobel, 92p, 1983.

MAZZUCHELLI, R. et al. Vascular endothelial growth factor expression and capillary architecture in high-grade PIN and prostate cancer in untreated and androgen-ablated patients. *Prostate*, v. 45, n. 1, p. 72–79, 2000.

MCKENNA, N. J.; LANZ, R. B.; O'MALLEY, B. W. Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology*. *Endocrine Reviews*, v. 20, n. 3, p. 321–344, 1 jun. 1999.

MCNEAL, J. E. Normal histology of the prostate. *The American journal of surgical pathology*, v. 12, n. 8, p. 619–33, ago. 1988.

MCPHERSON, S. J. et al. Elevated androgens and prolactin in aromatase-deficient mice cause enlargement, but not malignancy, of the prostate gland. *Endocrinology*, v. 142, n. 6, p. 2458–2467, 2001.

MELMED, S. et al. *Williams Textbook of Endocrinology*. 13. ed. Filadelfia: Elsevier, 2016.

MICALLEF, L. et al. The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair. *Fibrogenesis and Tissue Repair*, v. 5, n. SUPPL.1, 6 jun. 2012.

MIKSITS, M. et al. Antitumor activity of resveratrol and its sulfated metabolites against human breast cancer cells. *Planta medica*, v. 75, n. 11, p. 1227–30, set. 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. VIGITEL BRASIL 2018 : Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Brasília: [s.n.].

Montgomery, D.C. (1991) Design and Analysis of Experiments. 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York.

MONTICO, F. et al. Reactive Stroma in the Prostate During Late Life: The Role of Microvasculature and Antiangiogenic Therapy Influences. *The Prostate*, v. 75, p. 1643–1661, 2015a.

MONTICO, F. et al. Prostatic angiogenic responses in late life: Antiangiogenic therapy influences and relation with the glandular microenvironment in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model. *Prostate*, v. 75, n. 5, p. 484–499, 1 abr. 2015b.

MUIR, C. S. Epidemiology, basic science, and the prevention of cancer: implications for the future. *Cancer research*, v. 50, n. 20, p. 6441–8, 15 out. 1990.

MUKHERJEE, B.; MAYER, D. Dihydrotestosterone interacts with EGFR/MAPK signalling and modulates EGFR levels in androgen receptor-positive LNCaP prostate cancer cells. *International Journal of Oncology*, v. 33, n. 3, p. 623–629, set. 2008.

NANASHIMA, N. et al. Phytoestrogenic activity of blackcurrant (*Ribes nigrum*) anthocyanins is mediated through estrogen receptor alpha. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 59, n. 12, p. 2419–2431, 1 dez. 2015.

NARITA, S. et al. Research Evidence on High-Fat Diet-Induced Prostate Cancer Development and Progression. *Journal of Clinical Medicine*, v. 8, n. 5, p. 597, 30 abr. 2019.

NELLEMAN, C. et al. Gene expression changes in rat prostate after activation or blocking of the androgen and estrogen receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 237, n. 1–2, p. 25–35, 2005.

NEVALAINEN, M. T. et al. Estrogen and prolactin regulation of rat dorsal and lateral prostate in organ culture. *Endocrinology*, v. 129, n. 2, p. 612–622, 1991.

NEVALAINEN, M. T. et al. Hormone regulation of human prostate in organ culture. *Cancer research*, v. 53, n. 21, p. 5199–207, 1 nov. 1993.

NEVALAINEN, M. T. et al. Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *Journal of Clinical Investigation*, v. 99, n. 4, p. 618–627, 1997.

- NG, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, v. 384, n. 9945, p. 766–781, 2014.
- NILSEN-HAMILTON, M. Transforming Growth Factor- β and Its Actions on Cellular Growth and Differentiation. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 24, n. C, p. 95–136, 1 jan. 1990.
- NOGUEIRA PANGRAZI, E. et al. Nintedanib treatment delays prostate dorsolateral lobe cancer progression in the TRAMP model: contribution to the epithelial-stromal interaction balance. *Cell Biology International*, v. 42, n. 2, p. 153–168, 1 fev. 2018.
- NURMIK, M. et al. In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers *International Journal of Cancer* Wiley-Liss Inc., , 2019.
- OKOSUN, I. S. et al. Abdominal adiposity and clustering of multiple metabolic syndrome in White, Black and Hispanic Americans. *Annals of Epidemiology*, v. 10, n. 5, p. 263–270, 2000.
- PARIKESIT, D. et al. The impact of obesity towards prostate diseases. *Prostate International*, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2016.
- PARK, S.-H. et al. Effects of dietary high fat on prostate intraepithelial neoplasia in TRAMP mice. *Laboratory animal research*, v. 29, n. 1, p. 39–47, 2013.
- PARK, S. et al. Cyanidin and malvidin in aqueous extracts of black carrots fermented with *Aspergillus oryzae* prevent the impairment of energy, lipid and glucose metabolism in estrogen-deficient rats by AMPK activation. *Genes & nutrition*, v. 10, n. 2, p. 455, mar. 2015.
- PEIFFER, D. S. et al. Chemoprevention of esophageal cancer with black raspberries, their component anthocyanins, and a major anthocyanin metabolite, protocatechuic acid. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, v. 7, n. 6, p. 574–84, jun. 2014.
- PERRY, K. T.; ANTHONY, C. T.; STEINER, M. S. Immunohistochemical localization of TGF β 1, TGF β 2, and TGF β 3 in normal and malignant human prostate. *Prostate*, v. 33, n. 2, p. 133–140, 1 out. 1997.
- PLANZ, B. et al. Androgen responsiveness of stromal cells of the human prostate: regulation of cell proliferation and keratinocyte growth factor by androgen. *J.Urol.*, v. 160, p. 1850–1855, 1998.
- PONGCHAIYAKUL, C. et al. Prediction of percentage body fat in rural thai population using simple anthropometric measurements. *Obes.Res.*, v. 13, n. 1071- 7323 (Print), p. 729–738, 2005.

POWELL, E. et al. Identification of estrogen receptor dimer selective ligands reveals growth-inhibitory effects on cells that co-express ER α and ER β . *PLoS ONE*, v. 7, n. 2, 7 fev. 2012.

POWELL, K. Obesity: The two faces of fat. *Nature*, v. 447, n. 7144, p. 525–527, 2007.

PRICE, A. J. et al. Insulin-like growth factor-I concentration and risk of prostate cancer: Results from the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, v. 21, n. 9, p. 1531–1541, set. 2012.

PRINS, G. S.; BIRCH, L. The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to estrogen. *Endocrinology*, v. 136, n. 3, p. 1303–1314, 1995.

QUIGLEY, C. A. et al. Androgen receptor defects: Historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocrine Reviews*, v. 16, n. 3, p. 271–321, 1995.

RAJABI, M.; MOUSA, S. A. The role of angiogenesis in cancer treatment *Biomedicines* MDPI AG, , 1 jun. 2017.

REDDIVARI, L. et al. Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells through activation of caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Carcinogenesis*, v. 28, n. 10, p. 2227–35, out. 2007.

REEVES, P. G.; ROSSOW, K. L.; LINDLAUF, J. Development and Testing of the AIN-93 Purified Diets for Rodents: Results on Growth, Kidney Calcification and Bone Mineralization in Rats and Mice. *The Journal of Nutrition*, v. 123, n. 11, p. 1923–1931, 1 nov. 1993.

REITER, E. et al. Effects of Pituitary Hormones on the Prostate. [s.l: s.n.].

RENEHAN, A. G. et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *The Lancet*, v. 371, n. 9612, p. 569–578, 2008.

REYNOLDS, A. R.; KYPRIANOU, N. Growth factor signalling in prostatic growth: Significance in tumour development and therapeutic targeting. *British Journal of Pharmacology*. Anais...fev. 2006

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds *Trends in Plant Science* Elsevier Ltd, , 1997.

RICHARDSON, P. What is cancer? *Practice Nursing*, v. 8, n. 18, p. 27–29, 4 nov. 1997.

RICKE, W. A. et al. Prostatic hormonal carcinogenesis is mediated by in situ estrogen production and estrogen receptor alpha signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 22, n. 5, p. 1512–20, maio 2008.

RISBRIDGER, G. P. et al. Oestrogens and prostate cancer. *Endocrine-related cancer*, v. 10, n. 2, p. 187–91, jun. 2003.

ROOSEN, J. et al. The effect of product health information on liking and choice. *Food Quality and Preference*, v. 18, n. 5, p. 759–770, jul. 2007.

ROWLEY, D. R. What might a stromal response mean to prostate cancer progression? *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 17, n. 4, p. 411–419, 1999.

ROY, A. K. et al. Regulation of Androgen Action. *Vitamins and Hormones*, v. 55, n. C, 1998.

SANTEN, R. J. et al. History of aromatase: Saga of an important biological mediator and therapeutic target *Endocrine Reviews*, jun. 2009.

SARTIPPOUR, M. R. et al. Ellagitannin-rich pomegranate extract inhibits angiogenesis in prostate cancer in vitro and in vivo. *International Journal of Oncology*, v. 32, n. 2, p. 475–480, fev. 2008.

SEERAM, N. P. et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 16, n. 6, p. 360–367, jun. 2005.

SEERAM, N. P. et al. Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 19, p. 7732–7737, 19 set. 2007.

SEYMOUR, E. M. et al. Regular tart cherry intake alters abdominal adiposity, adipose gene transcription, and inflammation in obesity-prone rats fed a high fat diet. *Journal of medicinal food*, v. 12, n. 5, p. 935–942, 2009.

SHANKAR, E. et al. High-fat diet activates pro-inflammatory response in the prostate through association of Stat-3 and NF- κ B. *Prostate*, v. 72, n. 3, p. 233–243, 2012.

SHARIFI, N. Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *JAMA*, v. 294, n. 2, p. 238, 13 jul. 2005.

SHI, Y.; MASSAGUÉ, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, v. 113, n. 6, p. 685–700, 2003.

SHIH, P.-H.; YEH, C.-T.; YEN, G.-C. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 55, n. 23, p. 9427–35, 14 nov. 2007.

SHIOTA, M. et al. The Role of Nuclear Receptors in Prostate Cancer. *Cells*, v. 8, n. 6, p. 602, 17 jun. 2019.

SHWEIKI, D. et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, v. 359, n. 6398, p. 843–845, 1992.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 69, n. 1, p. 7–34, 8 jan. 2019.

SILHA, J. V. et al. Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *International Journal of Obesity*, v. 29, n. 11, p. 1308–1314, nov. 2005.

SILVA, R. S. et al. Steroidal hormone and morphological responses in the prostate anterior lobe in different cancer grades after Celecoxib and Goniothalamine treatments in TRAMP mice. *Cell Biology International*, v. 42, n. 8, p. 1006–1020, 1 ago. 2018.

SIMPSON, E. R. et al. Aromatase cytochrome p450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Reviews*, v. 15, n. 3, p. 342–355, 1994.

SMITH, K. B.; SMITH, M. S. Obesity Statistics Primary Care - Clinics in Office Practice W.B. Saunders, , 1 mar. 2016.

SMITH, M. R. et al. Changes in Body Composition during Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 87, n. 2, p. 599–603, 2002.

SNOWDON, D. A.; PHILLIPS, R. L.; CHOI, W. Diet, obesity, and risk of fatal prostate cancer. *American Journal of Epidemiology*, v. 120, n. 2, p. 244–250, 1984.

SO, A. I.; HURTADO-COLL, A.; GLEAVE, M. E. Androgens and prostate cancer. *World Journal of Urology*, v. 21, n. 5, p. 325–337, 1 nov. 2003.

SONG, H. et al. Mulberry ethanol extract attenuates hepatic steatosis and insulin resistance in high-fat diet-fed mice. *Nutrition Research*, v. 36, n. 7, p. 710–718, 2016.

SOULITZIS, N. et al. Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGF β 1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. p. 305–314, 2006.

STEINER, M. S.; BARRACK, E. R. Transforming growth factor- β 1 overproduction in prostate cancer: Effects on growth in vivo and in vitro. *Molecular Endocrinology*, v. 6, n. 1, p. 15–25, 1 jan. 1992.

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.

SUN, D.-Y. et al. Cancer-associated fibroblasts regulate proliferation and migration of prostate cancer cells through TGF- β signaling pathway. *Life Sciences*, v. 235, p. 116791, out. 2019.

SUN, K. et al. Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 15, p. 5874–5879, 10 abr. 2012.

SUTTIE, A. et al. A Grading Scheme for the Assessment of Proliferative Lesions of the Mouse Prostate in the TRAMP Model. *Toxicologic Pathology*, v. 31, n. 1, p. 31–38, 2003.

TAHERGORABI, Z.; KHAZAEI, M. A review on angiogenesis and its assays. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, v. 15, n. 6, p. 1110–1126, nov. 2012.

TAIPALE, J.; KESKI-OJA, J. Growth factors in the extracellular matrix. *The FASEB Journal*, v. 11, n. 1, p. 51–59, jan. 1997.

TAYLOR, R. A.; RISBRIDGER, G. P. Prostatic tumor stroma: a key player in cancer progression. *Current cancer drug targets*, v. 8, n. 6, p. 490–497, 2008.

THOMPSON, T. C. et al. Transforming growth factor beta 1 as a biomarker for prostate cancer. *Journal of cellular biochemistry. Supplement*, v. 16H, p. 54–61, 1992.

TOBIAS PISCHON, U. N. AND H. B. Obesity and cancer *Proceedings of the Nutrition Society. Proceedings of the Nutrition Society*, v. 67, p. 128–145, 2008.

TOMAS, D. et al. Intensity of stromal changes predicts biochemical recurrence-free survival in prostatic carcinoma. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, v. 44, n. 5, p. 284–290, 2010.

TOMMELEIN, J. et al. Cancer-Associated Fibroblasts Connect Metastasis-Promoting Communication in Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*, v. 5, 23 mar. 2015.

TOREN, P.; MORA, B. C.; VENKATESWARAN, V. Diet, Obesity, and Cancer Progression: Are Adipocytes the Link? *Lipid Insights*, v. 6, p. LPI.S10871, jan. 2013.

TSIMOGIANNIS, D.; OREOPOULOU, V. Classification of Phenolic Compounds in Plants. In: Polyphenols in Plants. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 263–284.

TU, W. H. et al. The loss of TGF- β signaling promotes prostate cancer metastasis. *Neoplasia*, v. 5, n. 3, p. 267–277, maio 2003.

TURNER, N.; GROSE, R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 10, 2010.

TUXHORN, J. A.; AYALA, G. E.; ROWLEY, D. R. Review Article REACTIVE STROMA IN PROSTATE CANCER PROGRESSION. *Growth Factors*, v. 166, n. December, p. 2472–2483, 2001.

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

TUXHORN, J. A et al. Inhibition of Transforming Growth Factor- β Activity Decreases Angiogenesis in a Human Prostate Cancer-reactive Stroma Xenograft Model Advances in Brief Inhibition of Transforming Growth Factor- β Activity Decreases Angiogenesis in a. *Cancer research*, v. 62, p. 6021–6025, 2002b.

UMESALMA, S.; SUDHANDIRAN, G. Ellagic acid prevents rat colon carcinogenesis induced by 1, 2 dimethyl hydrazine through inhibition of AKT-phosphoinositide-3 kinase pathway. *European Journal of Pharmacology*, v. 660, n. 2–3, p. 249–258, 25 jun. 2011.

VAN DER VALK, E. S. et al. A comprehensive diagnostic approach to detect underlying causes of obesity in adults *Obesity Reviews* Blackwell Publishing Ltd, , 1 jun. 2019.

VAN MOORSELAAR, R. J. .; VOEST, E. . Angiogenesis in prostate cancer: its role in disease progression and possible therapeutic approaches. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 197, p. 239–250, 2002.

VANELLA, L. et al. Effects of ellagic acid on angiogenic factors in prostate cancer cells. *Cancers*, v. 5, n. 2, p. 726–738, jun. 2013.

VENKATESWARAN, V.; KLOTZ, L. H. Diet and prostate cancer: Mechanisms of action and implications for chemoprevention *Nature Reviews Urology*, ago. 2010.

VERMEULEN, A. et al. Estradiol in elderly men. *Aging Male*, v. 5, n. 2, p. 98–102, 2002.

WAHLE, K. W. J. et al. Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 698, p. 36–51, 2010.

- WALLACE, T. C.; SLAVIN, M.; FRANKENFELD, C. L. Systematic review of anthocyanins and markers of cardiovascular disease. *Nutrients*, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2016.
- WANG, C. et al. Resveratrol inhibited GH3 cell growth and decreased prolactin level via estrogen receptors. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, v. 114, n. 3, p. 241–248, abr. 2012a.
- WANG, L.-S. et al. Anthocyanins in black raspberries prevent esophageal tumors in rats. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, v. 2, n. 1, p. 84–93, jan. 2009.
- WANG, N. et al. Ellagic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenesis effects via VEGFR-2 signaling pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 134, n. 3, p. 943–955, ago. 2012b.
- WANG, Y. Z.; WONG, Y. C. Sex hormone-induced prostatic carcinogenesis in the noble rat: The role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the development of prostate cancer. *Prostate*, v. 35, n. 3, p. 165–177, 15 maio 1998.
- WANG, Z. et al. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 336, n. 4, p. 1023–7, 4 nov. 2005.
- WEIHUA, Z. et al. An endocrine pathway in the prostate, ERbeta, AR, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol, and CYP7B1, regulates prostate growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 21, p. 13589–94, 2002.
- WENNBO, H. et al. Transgenic mice overexpressing the prolactin gene develop dramatic enlargement of the prostate gland. *Endocrinology*, v. 138, n. 10, p. 4410–4415, 1997.
- WILLETT, W. C. et al. Weight, Weight Change, and Coronary Heart Disease in Women. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, v. 273, n. 6, p. 461–7, 1995.
- WILLIAMS, G. Aromatase up-regulation, insulin and raised intracellular oestrogens in men, induce adiposity, metabolic syndrome and prostate disease, via aberrant ER- α and GPER signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 351, n. 2, p. 269–278, 4 abr. 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global cancer data. International Agency for Research on cancer, n. September, p. 13–15, 2018.

- WU, C.-T. et al. TGF Beta1 Expression Correlates with Survival and Tumor Aggressiveness of Prostate Cancer. *Annals of surgical oncology*, v. 22 Suppl 3, p. S1587-93, dez. 2015.
- WU, T. et al. Inhibitory effects of sweet cherry anthocyanins on the obesity development in C57BL/6 mice. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 65, n. 3, p. 351–359, 2014.
- XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, v. 112, n. 12, p. 1821–1830, 15 dez. 2003.
- XU, H.; JIANG, H. W.; DING, Q. Insulin-like growth factor 1 related pathways and high-fat diet promotion of transgenic adenocarcinoma mouse prostate (TRAMP) cancer progression. *Actas Urológicas Españolas (English Edition)*, v. 39, n. 3, 2015.
- YAMAUCHI, S.; ITO, H.; MIYAJIMA, A. I κ B α , a nuclear I κ B protein, positively regulates the NF- κ B-mediated expression of proinflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 26, p. 11924–11929, jun. 2010.
- YANG, E. Y.; MOSES, H. L. Transforming growth factor β 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *Journal of Cell Biology*, v. 111, n. 2, p. 731–741, 1990.
- YANG, F. et al. Tumor and Stem Cell Biology FGFR1 Is Essential for Prostate Cancer Progression and Metastasis. 2013.
- YI, L. et al. Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity. *FEBS letters*, v. 584, n. 3, p. 583–90, 5 fev. 2010.
- YOSHIMOTO, M. et al. Antimutagenicity of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) roots. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 63, n. 3, p. 537–41, mar. 1999.
- ZAFRA-STONE, S. et al. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 51, n. 6, p. 675–683, jun. 2007.
- ZAR, M. A.; IRAVANI, M. M.; LUHESHI, G. N. Effect of nifedipine on the contractile responses of the isolated rat bladder. *J Urol*, v. 143, n. 4, p. 835–839, 1990.
- ZEISBERG, E. M. et al. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Research*, v. 67, n. 21, p. 10123–10128, 2007.

ZHAO, H. et al. Effects of aging on growth factors gene and protein expression in the dorsal and ventral lobes of rat prostate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 292, n. 2, p. 482–491, 2002.

ZHU, M.-L.; KYPRIANOU, N. Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*, v. 15, n. 4, p. 841–849, 2008.

9. ANEXOS

9.1. CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNICAMP



CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Adenocarcinoma do lobo anterior da próstata no modelo TRAMP frente a ingestão da dieta hiperlipídica e administração do extrato de Jabuticaba, registrada com o nº 4605-1/2017, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete e Jéssica Stephany Fernandes do Vale, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 28 de junho de 2017.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/07/2017-01/07/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/07/2017-01/07/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / C57BL/6/ - Tg(TRAMP)8247Ng/J
No. de animais:	10
Peso / Idade:	08 semanas / 25g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / C57BL/6/ - Tg(TRAMP)8247Ng/J
No. de animais:	40
Peso / Idade:	16 semanas / 25g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 28 de junho de 2017.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

9.2. DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS

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 **Efeito do extrato da casca de Jabuticaba na progressão do adenocarcinoma no lobo anterior da próstata em camundongos TRAMP associado a ingestão da dieta hiperlipídica**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 06 de Março de 2020

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Jéssica Stephany Fernandes do Vale**
RG n.º 47.776.081-8


Assinatura : _____
Nome do(a) orientador(a): **Prof. Dr.ª Valéria Helena Alves Cagnon Quitete**
RG n.º _____