



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

GIOVANA WERNECK BORTOLANZA

**RESPOSTA DE MARCADORES DE ANGIOGÊNESE NO MICROAMBIENTE
PROSTÁTICO EM CAMUNDONGOS SENIS FRENTE À ADMINISTRAÇÃO DO
EXTRATO DE BAGAÇO DO MARACUJÁ-AZEDO (*Passiflora edulis*)**

**RESPONSE OF ANGIOGENESIS MARKERS IN THE PROSTATIC
MICROENVIRONMENT OF SENILE MICE AFTER THE ADMINISTRATION OF
PASSION FRUIT (*Passiflora edulis*) BAGASSE EXTRACT**

**Campinas
2021**

GIOVANA WERNECK BORTOLANZA

**RESPOSTA DE MARCADORES DE ANGIOGÊNESE NO MICROAMBIENTE
PROSTÁTICO EM CAMUNDONGOS SENIS FRENTE À ADMINISTRAÇÃO DO
EXTRATO DE BAGAÇO DO MARACUJÁ-AZEDO (*Passiflora edulis*)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural com concentração na Área de Biologia Tecidual

Orientador: Profa. Dra. VALÉRIA HELENA ALVES CAGNON QUITETE

Coorientador: Dra. LARISSA AKEMI KIDO DE BARROS

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO, A SER DEFENDIDA
PELA ALUNA GIOVANA WERNECK
BORTOLANZA, E ORIENTADA PELA
PROFESSORA DRA VALÉRIA HELENA ALVES
CAGNON QUITETE

Campinas

2021

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

B648r Bortolanza, Giovana Werneck, 1996-
Resposta de marcadores de angiogênese no microambiente prostático em camundongos senis frente à administração do extrato de bagaço do maracujá-azedo (*Passiflora edulis*) / Giovana Werneck Bortolanza. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

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

1. Próstata. 2. Envelhecimento. 3. Neovascularização. 4. Maracujá. 5. Piceatannol. I. Cagnon, Valéria Helena Alves, 1967-. II. Kido, Larissa Akemi, 1988-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Response of angiogenesis markers in the prostatic microenvironment of senile mice after the administration of passion fruit (*Passiflora edulis*) bagasse extract

Palavras-chave em inglês:

Prostate

Aging

Neovascularization

Passion fruit

Piceatannol

Área de concentração: Biologia Tecidual

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Larissa Akemi Kido de Barros [Coorientador]

Túlio Hermes de Almeida

Luciana Bolsoni Lourenço

Data de defesa: 02-09-2021

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2740-502X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4225180262574558>

Campinas, 2 de setembro de 2021

MEMBROS DA COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Túlio de Almeida Hermes

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Profa. Dra. Larissa Akemi Kido (Coorientadora e Presidente da Comissão)

A Ata de defesa com as respectivas assinaturas encontra-se no Siga/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade,

DEDICATÓRIA

À minha avó, Elma Bortolanza, por ter sido, ainda mais, um exemplo de força e amor incondicional, mostrando que não há limites para se reerguer e amar de formas diferentes.

AGRADECIMENTOS

Ninguém trabalha sozinho. Nossas conquistas são sustentadas principalmente por nós, mas só são possíveis graças a uma rede de pessoas, instituições, coisas e circunstâncias.

Isso tudo só foi possível, em primeiro lugar, graças à minha fé, aos meus guias, a Deus, às almas para quem orei, ao meu anjo da guarda.

Agradeço também meus pais, Cláudia Roberta Werneck e Dilson Bortolanza, que me apoiaram financeira e emocionalmente por todos os caminhos que escolhi em minha vida profissional até o momento. Me ver cada dia mais parecida com vocês não era algo que eu imaginava de que teria tanto orgulho.

Aos meus irmãos, Carolina e Daniel Werneck Bortolanza, pelo apoio, pelo alívio cômico, pela parceria que construímos ao longo de todos estes anos, graças ao incentivo de nossos pais. Sou muito grata por ter nascido irmã de duas pessoas tão especiais.

À minha avó, Iracelis dos Santos Alier, pelas ligações às quartas feiras e as boas conversas sobre a vida, a saudade, o tempo. Pelas orações que fez por mim e pelo poder que elas tiveram em minha vida. E por me ensinar sobre amor e paciência.

Aos meus amigos de graduação mais próximos, Katia Yofukuji e Gustavo Faccin Andreotti, pelo apoio à distância e as visitas mais gostosas, por todos os anos de uma amizade que me enche o peito de alegria. Ao meu amigo Gabriel da Silva Cordeiro, meu primeiro amigo em Campinas e ex colega de casa, por todas as trocas nestes dois anos e pela amizade com que me presenteou. Aos amigos Mariana Silva, Thaina Cozzi, Mauro Luiz Brandão Junior, Yuri Bittencourt e Darley Barreto, por tornarem os dias e as noites em Barão Geraldo mais alegres e leves.

Ao Laboratório de Biologia da Reprodução, especialmente minha orientadora, Valéria Helena Alves Cagnon Quitete, por ter aberto as portas para mim e confiado em meu trabalho, pelo apoio e auxílio a mim prestados. À minha co-orientadora, Larissa Akemi Kido de Barros, por todo o suporte e os esforços em fazer com que tudo ficasse coerente e bem feito, e também por toda a experiência compartilhada. Aos colegas de laboratório, Celina de Almeida Lamas, pelos longos dias de Western Blotting e ajuda

nos demais experimentos e análises; Andressa Mara Baseggio, por compartilhar experiência, boas conversas e pela ajuda quando precisei; Isabela Maria Urra Rossetto, pelo comprometimento com as atividades do laboratório que auxiliaram todos nós em nossas pesquisas, pelos almoços e pelas conversas; Ellen Nogueira, por compartilhar sua experiência em laboratório e com biologia tecidual, pelo apoio e pelo suporte oferecidos; Felipe Rabelo, pelos cafés fortes depois do almoço e disposição em contribuir sempre que possível; Fábio Montico, pela inspiração profissional e pelos trabalhos publicados que me auxiliaram.

À Jaqueline de Carvalho Rinaldi, minha orientadora da graduação, por ter auxiliado em minha escolha de programa e de orientação, além do apoio e amizade quando precisei.

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, por me aceitar e oferecer suporte nestes anos. À Elaine Minatel, coordenadora do programa, pelos trabalhos prestados em sua função e pelos equipamentos emprestados nos experimentos.

Aos funcionários e equipe terceirizada da Unicamp, sobretudo do Instituto de Biologia, por tornarem tudo possível com seu trabalho.

RESUMO

A próstata é um órgão hormônio dependente, regulada por fatores androgênicos e estrogênicos ao longo de toda a vida. O desequilíbrio dos níveis destes hormônios é resultante do processo de envelhecimento, o qual implica em alterações morfofuncionais na próstata, tais como lesões proliferativas benignas ou malignas. Produtos naturais, como o extrato do bagaço de maracujá-azedo (EBM), têm apresentado resultados positivos em estudos como um importante agente quimiopreventivo. Este extrato apresenta em sua composição um polifenol conhecido como piceatannol (PIC), um análogo natural do resveratrol, muito estudado por suas propriedades antioxidantes e anticarcinogênicas. O PIC é encontrado em maiores quantidades nas sementes do maracujá-azedo (*Passiflora edulis*), utilizadas com remanescente de polpa na obtenção do extrato. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a resposta da próstata de camundongos senis tratados com o EBM, dando enfoque ao processo angiogênico. Camundongos FVB foram distribuídos em três grupos experimentais: Jovens (JV) – 18 semanas de idade, Senil controle (SN) e Senil tratado com EBM (SM) - 52 semanas de idade. O delineamento experimental *in vivo* se deu por meio da administração oral de EBM (10mg/Kg) ou veículo por 10 semanas, seguida da eutanásia e coleta do lobo ventral da próstata e de amostras do fígado, os quais foram processados para análises morfológica, morfométrica, imunohistoquímica e de Western Blotting. Os resultados demonstraram que o tratamento com EBM reduziu o consumo de ração e acentuou a perda de peso nos animais senis em relação aos jovens. A análise morfométrica indicou aumento de neoplasia intraepitelial prostática de baixo e alto grau e da espessura da camada fibromuscular no grupo SC, além da frequência relativa de epitélio atrófico, em relação aos animais jovens. A análise histopatológica qualitativa do fígado não indicou alterações morfológicas significativas após tratamento com EBM. O processo de envelhecimento levou ao aumento na frequência relativa de α -actina, VEGF, VEGFR-2, CD31 e TGF- β em comparação aos animais JV, indicando que o envelhecimento está associado a um desequilíbrio dos marcadores angiogênicos e não-angiogênicos no microambiente prostático. O

tratamento com EBM promoveu redução na imunomarcação de CD31 e VEGFR-2, enquanto intensificou a expressão de TGF- β e AR. O envelhecimento está associado à redução na ingestão de ração, à perda de peso e à incidência de lesões prostáticas proliferativas e não-proliferativas. A atenuação dos níveis de CD31 e VEGFR-2 sugere uma atuação do EBM na via angiogênica da microcirculação. O EBM promoveu redução nos níveis de ER- α , um importante indicador e indutor de lesões na próstata, sugerindo uma nova alteração da sinalização hormonal, além do AR. Identificamos o EBM como um potencial regulador hormonal, nas respostas androgênica e estrogênica, fator que contribui para a manutenção do equilíbrio hormonal que evita as doenças prostáticas comuns ao envelhecimento. Sugere-se sua associação a outras drogas já utilizadas no tratamento de distúrbios prostáticos, principalmente quando estes estão associados à senescência.

Palavras-chave: Próstata; Envelhecimento; Angiogênese; Maracujá; Piceatannol

ABSTRACT

The prostate is a hormone-dependent organ, regulated by androgenic and estrogenic factors throughout life. The aging process causes an imbalance in the levels of these hormones, which implies in prostate morphofunctional changes, such as benign or malignant lesions. Studies have shown positive results with the use of natural products, such as passion fruit bagasse extract (PFBE), which have proved to be an important chemopreventive agent. This extract has in its composition, a polyphenol known as piceatannol (PIC), a resveratrol analogue, widely studied for its antioxidant and anticarcinogenic properties. PIC is found in larger amounts in the seeds of passion fruit (*Passiflora edulis*), used with pulp remnant to obtain the extract. This study aims to evaluate the prostate response of senile mice treated with PFBE, focusing on the angiogenic process. FVB mice were divided into three experimental groups: Young (JV), Senile (SC) and SM (52 weeks old mice, treated with PFBE). *In vivo* experimental design, mice received the extract by oral administration of PFBE (10mg/Kg) or vehicle for 10 weeks (feed and water ad libitum), followed by euthanasia and extraction of prostate ventral lobe and liver samples. After that, the tissue samples were evaluated by means of morphological, morphometric, immunohistochemical and Western Blotting analysis. The results showed that the PFBE treatment reduced the feed intake and increased weight loss in senile animals, compared to the Young ones. The morphometric analysis indicated an increase of the low and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and fibromuscular layer thickness in the SC group, as well as of the relative frequency of atrophic epithelium, compared to the young group. Qualitative histopathological analysis of the liver did not show significant morphological changes after the PFBE treatment. The aging process led to an increase in the relative frequency of α -actin, VEGF, VEGFR-2, CD31 and TGF- β , compared to YN group, which indicates that the aging process is associated with an imbalance of angiogenic and non-angiogenic markers in prostatic microenvironment. PFBE treatment reduced the immunostaining of CD31 and VEGFR-2. The aging process is associated to feed decrease, weight loss and the incidence of proliferative and non-proliferative prostate lesions. The decrease of CD31 and VEGFR-2 levels suggests that PFBE acts in the

angiogenic pathway of the microcirculation. PFBE decreased the ER- α levels, which is an important indicator of prostate lesions, suggesting a new hormonal signaling alteration in addition to AR. We identified PFBE as a potential hormonal regulator, in both in androgenic and estrogenic responses, a factor that contributes to the maintenance of hormonal balance that prevents the prostate diseases that are common in the aging process. Its association with other drugs could be suggested, especially, considering the senescence.

Key-words: Prostate; Aging; Angiogenesis; Passion Fruit; Piceatannol

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fotografias de camundongos FVB. **(A)** Medida relativa do camundongo em centímetros. **(B)** Aparelho reprodutor exposto através de incisão ventral em “v”, permitindo visualização da bexiga (B), vesículas seminais (VS), testículos (T) e lobos prostáticos ventrais (LV) e anteriores/glândula de coagulação (LA). Aumento 12,5x.....35

Figura 2. (A) Consumo médio diário de ração. (B) Ganho absoluto de peso. Diferença estatisticamente significativa em **(A)** entre os grupos SC e SM e **(B)** entre os grupos SC e SM. * $p < 0.05\%$, ANOVA One-way seguido pelo teste de Dunnett, considerando: * $p < 0,05\%$ e ** $p < 0,01\%$ (comparação com o grupo controle SC).....41

Figura 3: Fotomicrografias do lobo ventral da próstata de camundongos FVB. **GRUPO JV- (A-D):** epitélio secretor simples, com células luminais e basais (cb). Estroma fibromuscular de aspecto normal e delgado. **GRUPO SC (E-H):** Focos de proliferação do epitélio glandular classificados como neoplasia intraepitelial prostática (NIP), foco de atrofia (cabeça de seta) e presença de microácino (mc). **(G)** Estroma fibromuscular hiperplásico e hipertrófico. **(H)**, detalhe para foco de proliferação epitelial (NIP) e espessamento da camada de células musculares lisas (cabeça de seta branca). **GRUPO SM - (I-L):** epitélio secretor simples, com células cúbicas a colunares e focos de atrofia epitelial (cabeça de seta). Estroma prostático de aspecto normal com eventuais pontos de hipertrofia das células musculares lisas (cabeça de seta branca). JV: jovem; SC: senil; SM: senil tratado com extrato do bagaço do maracujá; Ep: epitélio; St, estroma; L: lúmen; cb (célula basal). Hematoxilina-Eosina (A-C; B-G; I-K); Tricrômico de Masson (D, H, L).....44

Figura 4: Fotomicrografias da próstata ventral de camundongos FVB. **(A-C)** Grupo JV: células basais do epitélio (setas) e delgada camada fibromuscular. **(D-F)** Grupo SC: neoplasia intraepitelial prostática (NIP) em E e F, microácino (mic), atrofia epitélio-glandular (cabeça de seta), infiltrado inflamatório (inf) e adenocarcinoma bem diferenciado (círculo descontínuo) e camada fibromuscular espessa (+). **(G-I)** Grupo SM: camada fibromuscular espessa (+) e região de atrofia (cabeça de seta). JV: jovem; SC: senil; SM: senil tratado com extrato do bagaço do

maracujá; Ep: epitélio; St, estroma; L: lúmen. Hematoxilina-Eosina (A, B, C, E, G, I); Tricrômico de Masson (D, F, H).....45

Figura 5: Análise morfométrica do lobo ventral da próstata de camundongos FVB dos grupos JV, SC e SM. (A) Epitélio total. **(B)** Epitélio Saudável. **(C)** Epitélio atrófico. **(D)** Neoplasia Intraepitelial Prostática. **(E)** Estroma. **(F)** Camada Fibromuscular. **(G)** Lúmen glandular total. JV: jovem; SC: senil; SM: senil tratado com extrato do bagaço do maracujá. Ep: epitélio; St, estroma; L: lúmen. Teste estatístico One-Way ANOVA, seguido do pós teste de Dunnet, considerando * $p < 0,05\%$; ** $p < 0,01\%$ **** $p < 0,0001\%$. JV: jovem; SN: senil; SM: senil tratado com extrato do bagaço do maracujá.....47

Figura 6: Tecido hepático dos diferentes grupos experimentais, JV (**A** e **B**), SC (**C** e **D**) e SM (**E** e **F**). Hepatócitos (setas), hepatócitos de núcleo e citoplasma de volume aumentado (cabeças de seta) e veia centrolobular do fígado (contorno), e presença de infiltrado inflamatório (círculo vermelho). Coloração em H.E.....48

Figura 7. Imunomarcagem dos antígenos α -actina (**A-C**), CD31 (**D-F**), VEGF (**G-I**), VEGFR-2 (**J-L**) e TGF- β (**M-O**), no lobo ventral da próstata de camundongos FVB. JV: jovem; SC: senil; SM: senil tratado com extrato do bagaço do maracujá. Contracoloração em Hematoxilina. As setas indicam a imunoreatividade positiva dos antígenos.....50

Figura 8. Frequência relativa da imunomarcagem de α -actina (**A**), CD31 (**B**), VEGF (**C**), VEGFR-2 (**D**) e TGF- β (**E**) no lobo ventral da próstata de camundongos FVB. Teste estatístico One-Way ANOVA, seguido do pós teste de Dunnet, considerando * $p < 0,05\%$; ** $p < 0,01\%$ **** $p < 0,0001\%$. JV: jovem; SN: senil; SM: senil tratado com extrato do bagaço do maracujá.....51

Figura 9. Quantificação dos níveis proteicos para as diferentes moléculas avaliadas: (**A**) α -actina, (**B**) VEGF, (**C**) TGF- β , (**D**) ER- α e (**E**) AR. Membranas representativas indicando o efeito do EBM na próstata ventral de animais senis (**F**). Teste estatístico One-Way ANOVA, seguido de Dunnet's, considerando $p < 0,05\%$ para significância estatística, considerando * $p < 0,05\%$; ** $p < 0,01\%$ **** $p < 0,0001\%$. JV: jovem; SN: senil; SM: senil tratado com extrato do bagaço do maracujá.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos primários e secundários e diluições utilizadas na técnica de imunohistoquímica.....38

Tabela 2: Anticorpos primários e secundários e diluições utilizadas nas técnicas de western blotting.....39

LISTA DE ABREVIATURAS

AR – receptor de andrógeno

BSA – albumina de soro bovino

CD31 – molécula de adesão celular plaquetária ou cluster de diferenciação 31

DAB – 3,3'- diaminobenzidina

EBM – extrato do bagaço do maracujá-azedo

ER- α – receptor de estrógeno alfa

ER- β – receptor de estrógeno beta

FGF – fator de crescimento fibroblástico

HIF-1 α – fator induzível por hipóxia 1 alfa

HPB – hiperplasia prostática benigna

IGFR-1 – fator de crescimento homólogo à insulina tipo 1

IL-6 – interleucina-6

JV – grupo jovem controle

LV – lobos ventrais

MMP-2 – metaloproteinase 2

MMP-9 – metaloproteinase 9

MVD – densidade de microvasos

NIP – neoplasia intraepitelial prostática

PIC – piceatannol

PCNA – antígeno nuclear de proliferação celular

SC – grupo senil controle

SM – grupo senil tratado com EBM

STAT-3 – transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

TGF- β – fator de crescimento transformante beta

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-2 – receptor do fator de crescimento endotélio vascular 2

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	18
1.1.	Próstata: generalidades e morfologia.....	18
1.2.	Próstata: Regulação Hormonal.....	19
1.3.	Envelhecimento e seus efeitos na próstata.....	22
1.4.	Angiogênese.....	24
1.5.	Maracujá e Compostos Bioativos.....	28
2.	JUSTIFICATIVA.....	31
3.	OBJETIVOS.....	33
3.1.	Objetivo Geral.....	33
3.2.	Objetivos Específicos.....	33
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1.	Extrato do Bagaço do Maracujá.....	34
4.2.	Protocolo Experimental <i>in vivo</i>	34
4.2.1.	Animais e Procedimento Experimental.....	34
4.2.2.	Microscopia de Luz.....	35
4.2.2.1.	Análise Morfológica e Morfométrica da Próstata.....	36
4.2.3.	Imunohistoquímica.....	36
4.2.4.	Western Blotting.....	38
4.2.5.	Análise Histopatológica do Fígado.....	39
4.2.6.	Análise Estatística.....	40
5.	RESULTADOS.....	41

5.1.	Ganho Relativo de Peso Corporal e Consumo de Ração.....	41
5.2.	Morfologia e Morfometria.....	41
5.2.1.	Grupo Jovem.....	41
5.2.2.	Grupo Controle Senil.....	42
5.2.3.	Grupo Senil Tratado com Extrato do Bagaço do Maracujá.....	42
5.3.	Análise Histopatológica do Fígado.....	47
5.4.	Análise Imunohistoquímica.....	48
5.5.	Western Blotting.....	52
6.	DISCUSSÃO.....	55
7.	REFERÊNCIAS.....	62
8.	ANEXOS.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. Próstata - Generalidades e Morfologia

A próstata é uma glândula acessória do sistema reprodutor masculino de mamíferos, compacta no homem, situada póstero-inferiormente à bexiga, ao redor da porção prostática da uretra. A secreção produzida pela próstata juntamente com o líquido seminal auxilia na motilidade e nutrição dos espermatozoides. Nos roedores, a próstata é dividida em lobos classificados de acordo com sua posição em relação à uretra (anteriores, ventrais, laterais e dorsais), e que se conectam entre si por meio de seus ductos (Jesik et al., 1982; Marker et al., 2003). Os lobos dorsal (LD) e lateral (LL) são frequentemente remetidos como um único lobo na literatura, o lobo dorsolateral, em função da ligação entre estes através de um istmo (Jesik et al., 1982; Roy-Burman et al., 2004). O lobo anterior (LA), ou glândula de coagulação (GC), em par, é localizado na face côncava das vesículas seminais, é também atribuído como parte da glândula prostática (Sugimura et al., 1986; Marker et al., 2003).

O primeiro autor a descrever a anatomia prostática dos roedores dividindo-a em lobos e dando enfoque para seu desenvolvimento embriológico foi Lowsley, em 1912 (Lowsley, 1912; McNeal, 1972). Tal divisão em lobos garante a estes animais, diante dos demais mamíferos, um padrão distinto para a organização e ramificação dos ductos, pela constituição de sua secreção e pela dinâmica histológica e sensibilidade aos hormônios (Aumüller & Seitz, 1990; Banerjee et al., 1998).

Modelos de roedores têm sido estudados para mimetizar a próstata humana e investigar doenças no órgão, e isso se deve principalmente à similaridade dos genomas humano e destes animais (Rosenthal & Brown, 2007; Oliveira et al., 2016). As semelhanças entre as espécies se pautam na sensibilidade a andrógenos e na histologia, já que tanto em humanos quanto em roedores, a glândula apresenta estrutura alveolar, com epitélios semelhantes em morfologia e funcionalidade, além de apresentarem morfogênese análogo (Timms et al., 1994; Roy-Burman et al., 2004; Shappel et al., 2004).

O complexo glandular que constitui a próstata é túbulo-alveolar, com ductos excretores, pelos quais sua secreção se transporta para a luz da uretra prostática (Niu & Xia, 2009). Os ácinos prostáticos são compostos por epitélio secretor simples, com células epiteliais secretoras e basais, as quais encontram-se separadas do estroma pela membrana basal. O compartimento estromal que envolve os ácinos é composto por células musculares lisas, elementos fibrilares, células do sistema imunológico, vasos sanguíneos e terminações nervosas e fatores de crescimento. Os componentes estruturais produzidos pelas células musculares lisas presentes no estroma compreendem de colágenos, fibronectina e glicosaminoglicanos (Tuxhorn et al., 2001; Bianchi-Frias et al., 2010). Toda síntese da matriz extracelular é promovida pelos fibroblastos e fibras musculares do tecido (Tuxhorn et al., 2001; Bianchi-Frias et al., 2010).

Uma rede de fibras reticulares presentes no estroma se organiza na base das células dos ácinos prostáticos desde o período intrauterino, durante a formação do órgão em ratos (Vilamaior, 2003). Alterações na próstata, como a castração androgênica, implicam em uma remodelação fibrilar das fibras colágenas da matriz, uma possível consequência para o papel de remodelação do estroma desempenhado pelas células musculares lisas (Vilamaior, 2003). De fato, o músculo liso é responsável pela regulação de quiescência e crescimento prostáticos durante a fase adulta (Hayward et al., 1997). As interações entre músculo e epitélio são uma peça chave para a manutenção da homeostase do órgão e, em desequilíbrio, para o desenvolvimento de doenças. (Hayward et al., 1997). As células musculares lisas respondem, por exemplo, a um desenvolvimento anormal do epitélio, tornando-se indicativos deste desequilíbrio (Hayward et al., 1997). O tumor também pode atuar no aumento da proliferação de fibroblastos no estroma (Hayward et al., 1997).

1.2. Próstata: Regulação Hormonal

O processo de regulação hormonal da próstata envolve fatores extrínsecos e intrínsecos, sendo os hormônios andrógenos relacionados a um papel de maior

importância dentre os fatores extrínsecos (Lee et al., 1997). Os fatores extrínsecos compreendem fatores hormonais, alimentares, genéticos e de origem imunológica, enquanto que os fatores intrínsecos englobam as moléculas envolvidas na interação epitélio-estroma (Lee et al., 1997). Entre os fatores extrínsecos mais comuns destaca-se o hormônio di-hidrotestosterona (DHT), de grande afinidade aos receptores de andrógeno (AR), além de estrógenos, corticoides, prolactina e insulina (Cunha et al., 1987). A enzima prostática 5α -redutase é a responsável por promover a conversão de testosterona em DHT, se apresentando, portanto, como fundamental na manutenção da próstata (Rittmaster et al., 1991; Wright et al., 1999).

Os hormônios androgênicos são os principais reguladores das funções, estrutura e desenvolvimento da próstata, com destaque para a testosterona e a DHT, responsáveis pela diferenciação celular no órgão (Toorians et al., 2003; Imamov et al., 2005). O epitélio secretor sofre interferência dos hormônios androgênicos, que atuam como indutores de proliferação, o que torna a castração androgênica um método comumente utilizado no tratamento de tumores prostáticos (Carvalho-Salles & Tajara, 1999). Roedores e seres humanos apresentam uma população celular classificada como células-tronco, as células basais, que fazem parte do epitélio da próstata e são andrógeno-independentes, porém, responsivas e sensíveis para estes hormônios (Vilamaior et al., 2000; Taylor & Risbridger, 2008). Estas células-tronco são responsáveis pela capacidade de regeneração das células luminais do epitélio, que respondem e dependem de andrógeno, apresentando uma maior quantidade de AR, o que explicaria os casos recorrentes de resistência à castração androgênica (Taylor & Risbridger, 2008). As células basais não apresentam quantidade significativa de AR em comparação às luminais, entretanto, são muito sensíveis a estrogênio, o que faz com que continuem proliferando durante a terapia por castração (Collins & Matiland, 2006). As células do músculo liso, localizadas na posição periacinar, também sofrem alteração fenotípica na ausência de andrógenos (Antonioli et al., 2004). Além dos andrógenos, também os estrógenos atuam com a testosterona, contribuindo para a manutenção das funções prostáticas, bem como para o desenvolvimento de doenças (Cunha et al., 2002).

O AR situa-se no citoplasma e atua na próstata como um fator de transcrição indispensável para o desenvolvimento e manutenção do órgão. Através de sua ligação aos andrógenos, à testosterona e ao DHT, o AR forma dímeros e se torna capaz de migrar para o núcleo (Heinlein & Chang, 2002). No núcleo, o AR é ativa ou inibe a expressão de uma variedade de genes, além de ativar vias de sinalização e intervir na célula, após formação do conjunto hormônio-receptor, atuando na transcrição dos genes-alvo (Heinlein & Chang, 2002; Lazar, 2002). No epitélio mesenquimal, durante a fase embrionária, o AR é responsável pelo desenvolvimento urogenital via interações entre mesênquima e epitélio, sendo precursor na formação dos brotos de epitélio prostático (Takeda et al., 1985; Cunha, 1992; Cunha, 2004).

Os receptores de estrógeno (ERs), que se ligam a hormônios estrogênicos, constituem uma classe da superfamília de receptores nucleares que atuam na transcrição e regulação de expressão gênica, assim como os ARs (Aranda & Pascual, 2001; Krishnan et al., 2001). As subcategorias dos ERs são conhecidas por ER α e ER β , ou ER1 e ER2, que diferem desde os genes responsáveis por sua codificação, embora ambos sejam receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição (Heldring et al., 2007; Ellmann et al., 2009).

Os receptores de hormônios estrogênicos e androgênicos são distribuídos de forma distinta de acordo com o lobo prostático a que pertencem. Esta é a razão pela qual a atuação dos hormônios em cada lobo se apresenta particular (Cândido, 2013). Os ARs são alvos na pesquisa de câncer de próstata desde 1940, já que cumpre um papel na progressão da doença regulando antígenos como o PSA, comumente utilizado como marcador do câncer de próstata (Mohler, 2008; Schmidt & Tindall, 2013). O processo de castração androênica, utilizado no tratamento do câncer de próstata, consiste no uso de agentes antagonistas que ocupem os ARs (Mohler, 2008). Entretanto, muitas vezes esta privação não é bem sucedida em pacientes com idade avançada, já que as células carcinogênicas podem atenuar seus efeitos. Estudos estão sendo realizados no genoma do AR afim de encontrar uma resposta para este problema, conhecido como câncer de próstata resistente à castração (CRPC) (Schmidt & Tindall, 2013). Nos lobos dorsal e ventral, por exemplo, o AR tem uma intensa imunorreação no epitélio,

enquanto nas glândulas de coagulação estes receptores têm predominância estromal. Da mesma forma, os ERs do tipo β se encontram com maior recorrência no epitélio do lobo ventral e no estroma das glândulas de coagulação, enquanto o tipo α tem maior incidência no estroma em todos os lobos (Cândido, 2013). Estes aspectos permitem inferir que os hormônios atuam sobre a próstata de forma lobo-específica na manutenção tecidual e desenvolvimento de lesões. (Cândido, 2013).

1.3. Envelhecimento e seus efeitos na próstata

A senescência é conhecida como o conjunto de eventos que envolvem redução do potencial proliferativo das células pré-existentes, perda de funções celular e metabólica e problemas relacionados ao DNA (Banerjee et al., 2001; Badiola et al., 2015). Na próstata, o desequilíbrio hormonal decorrente do envelhecimento é um dos principais fatores que promove alterações morfológicas e funcionais em diversas espécies animais, inclusive em seres humanos (Roy-Burman et al., 2004).

Segundo Banerjee et al., (2000), o envelhecimento está diretamente ligado à queda nos níveis epiteliais de DHT na próstata, o contrário do que ocorre com os níveis de estradiol e estrona, aumentados no epitélio e no estroma. O desequilíbrio glandular relacionado ao avanço da idade pode, portanto, ser atribuído principalmente às mudanças significativas nas taxas de esteróides (Cândido et al., 2013). Cada lobo da próstata apresenta reatividade específica aos hormônios, e este gradiente, somado à íntima comunicação estabelecida entre epitélio e estroma, é responsável pela homeostase da próstata (Cândido et al., 2013). Entretanto, os mesmos fatores citados também têm atuação no desenvolvimento de lesões no órgão, sejam estas benignas ou malignas (Cândido et al., 2013). Em ratos idosos linhagem Brown Norway, a imunomarcagem de AR se apresentou reduzida nos lobos dorsal e lateral, e aumentada no lobo ventral quando comparado a animais jovens (Banerjee et al., 2000). Níveis séricos de testosterona também mostraram redução proporcional em relação aos de estradiol com o avanço da idade (Banerjee et al., 2000). O bloqueio androgênico utilizado em tratamentos do câncer de próstata, por exemplo, atua de forma distinta

entre os diferentes lobos prostáticos no que diz respeito a mecanismos de resposta apoptótica (Banerjee et al. 2000). Além disso, a sensibilidade das células em apoptose após a ablação androgênica é alterada com avanço da idade, principalmente no lobo ventral (Banerjee et al., 2000), demonstrando que o envelhecimento é fator decisivo na resposta a tratamentos na próstata.

Na próstata de animais idosos é possível observar maior incidência neoplasia intraepitelial prostática (NIP), atipia nuclear das células do epitélio secretor, atrofia, bem como a formação de microácinos a partir de ácinos preexistentes e a ocorrência de adenocarcinoma bem diferenciado (Montico et al., 2014). A HPB e o câncer de próstata são exemplos de lesões prostáticas comuns associadas ao processo de envelhecimento, em função das alterações das características fenotípicas do órgão (Bianchi-Frias et al., 2010).

No microambiente estromal as mudanças são tanto fenotípicas quanto moleculares e participam ativamente no desenvolvimento de doenças comuns na próstata durante a senescência (Bianchi-Frias et al., 2010). A desorganização da matriz de colágeno é uma das consequências da senescência e, embora o colágeno seja encontrado em abundância na próstata neste período da vida, as fibras encontradas no estroma se dispõem desorganizadas, alterando a morfofisiologia do órgão (Bianchi-Frias et al., 2010). Além disso, é característica comum do estroma prostático de animais idosos a presença de infiltrados inflamatórios (Bianchi-Frias et al., 2010; Montico et al., 2014; Kido et al., 2017).

Aumento na expressão de marcadores estromais como α -actina e vimentina, assim como maior recrutamento de fibroblastos positivos duplos para as proteínas CDK4/ α -actina e CDK4/vimentina foram observados na próstata de animais senis, demonstrando que o processo de reatividade estromal é fator determinante no aparecimento de lesões (Montico et al., 2015). A α -actina desempenha um papel fundamental na manutenção do citoesqueleto e em movimentos celulares que envolvem principalmente a contração muscular (Ruan & Lai, 2007; Gunst & Zhang, 2008; Kim, 2008). Alterações em sua expressão podem indicar correlação com certos tipos de neoplasia de natureza maligna, já que é uma molécula relacionada ao reparo

tecidual (De Fonseca et al., 2012; Sinn et al., 2014). Outras alterações não proliferativas são comuns na próstata de animais senis, como a perda da adesão entre as células do epitélio secretor e as células do epitélio basal, evidências inflamatórias oxidativas e alterações nas células epiteliais e danos observados no compartimento estromal (Bianchi-Frias et al., 2010; Montico et al., 2014; Lamas et al., 2020).

1.4. Angiogênese

A angiogênese é um processo vital para o desenvolvimento e funcionamento do organismo, sendo caracterizada pela formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. (Senger & Davis, 2011). O processo angiogênico tem seu início a partir do recrutamento das células endoteliais, seguido pela degradação da membrana basal vascular e do que se denomina brotamento vascular, sendo que este ocorre no interstício celular, onde simultaneamente ao brotamento há ligações da matriz extracelular com proteínas do tipo integrinas (Senger & Davis, 2011). Este processo é mediado por fatores de crescimento, enzimas, quimiocinas, moléculas de adesão e receptores endoteliais específicos (Liekens et al., 2001). Já na fase de inibição, ao fim do processo angiogênico, há um aumento da concentração de inibidores endógenos ou regulação negativa dos próprios fatores angiogênicos (Liekens et al., 2001).

A regulação natural do processo angiogênico se dá para que não haja uma demanda de neovascularização maior que as necessidades do tecido, o que implicaria em excesso nas taxas de oxigênio, levando a estresse oxidativo e formação de novos radicais livres (Polverini, 2002). No caso dos tumores, este controle entra em desequilíbrio (Polverini, 2002). Apesar de ser fundamental em processos como o crescimento e desenvolvimento dos tecidos durante o período intra-uterino e mesmo durante o desenvolvimento pós-natal e adulto, a angiogênese atípica pode participar de eventos como o desenvolvimento de doenças, cicatrização inadequada de feridas, inflamação e progressão tumoral (Li et al., 2017). Os reguladores da angiogênese estão organizados em dois grupos: indutores (ou promotores endógenos) e inibidores endógenos. Estes fatores são produzidos e secretados por células de natureza diversa,

a depender do tecido em questão (Polverini, 2002). Além disso, a angiogênese também se relaciona diretamente com o estresse oxidativo. Quando este está em equilíbrio, a angiogênese tende a manter-se em equilíbrio e realizar reparos teciduais adequados (Huang & Guang-Xian, 2019). Podemos citar entre os fatores indutores o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento de células endoteliais derivadas de plaquetas (PDGF), fatores de crescimento derivados de plaquetas (como a prostaglandina, heparina, angiotensina) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Polverini, 2002). Já dentre os fatores inibidores envolvidos na angiogênese, encontram-se a angiostatina, a endostatina, o fator plaquetário, a prolactina, a trombospondina, a interleucina 10, interferons, retinóides, o antígeno específico prostático (PSA) e os inibidores 1, 2 e 3 de metaloproteinase (MMP) (Brat & An Meir, 2001; Polverini, 2002; Van Moorselar & Voest, 2002).

Durante o período de senescência, as células perdem grande parte da capacidade de produção de fatores pró-angiogênicos, como é o caso do VEGF (Rivard et al., 1999). No entanto, fibroblastos senescentes são capazes de produzir elevadas taxas de VEGF que compensam a escassez desse tipo de fatores durante o envelhecimento, o que pode ser uma das possíveis explicações para o aumento de lesões neoplásicas (Sprenger et al., 2008). Segundo Montico et al., (2014), níveis elevados de estrógeno induzem o aumento de VEGF na próstata de camundongos senis. Paralelamente, o estroma reativo também é outro fator que contribui para o recrutamento de células endoteliais a partir de vasos situados nas regiões periacinares (Montico et al., 2015). O aumento das MMP-2 e MMP9 induz a uma maior permissividade do ambiente para o crescimento tumoral, associando-se à capacidade de desenvolvimento de tumores expressivos em ratos idosos (Reed et al., 2006). A imunomarcagem pelo antígeno CD31 confirmou o aumento da rede de microvasos na próstata de camundongos idosos e, também, de camundongos transgênicos para adenocarcinoma de próstata (TRAMP) no início do desenvolvimento da doença (Kido et al., 2014, Montico et al., 2015, Shi et al., 2018)

Inicialmente, lesões proliferativas contam com a mesma rede vascular original do tecido, e isso promove hipóxia conforme as células se multiplicam, implicando no

recrutamento de novos vasos sanguíneos como condição de sobrevivência das células epiteliais (Huss et al., 2001; Liekens et al., 2001; Macpherson et al., 2003). Tumores malignos em estágios avançados demandam maior drenagem e irrigação sanguínea para nutrir suas células e garantir seu crescimento e, para que isso seja possível suas células epiteliais recrutam células do endotélio presentes no estroma, e estas formam vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (Tuxhorn et al., 2001; Van Moorselaar & Voest, 2002; Condon et al., 2005). A hipóxia é o fator determinante que dá início ao *switch* angiogênico, evento precoce da carcinogênese que marca o momento de capacitação das células tumorigênicas para produção de fatores angiogênicos próprios para sua nutrição e crescimento (Huss et al., 2001; Zhong et al., 2004). O fator induzível por hipóxia (HIF-1 α) é um dos que sofre aumento em sua expressão no microambiente durante o envelhecimento, seguido pelo fator de VEGF, FGF-2 e aumento na densidade de microvasos (Montico et al., 2014). Ao mesmo tempo, estas células alteradas reduzem a produção dos fatores inibitórios da formação de novos vasos, uma função também desempenhada por drogas anti-angiogênicas (Doll et al., 2001; Montico et al., 2015). Desta maneira, o bloqueio de moléculas sinalizadoras do processo angiogênico poderia ser uma forma de prevenir o aparecimento de possíveis focos de lesão na próstata durante o processo de envelhecimento.

Inibidores da angiogênese atuam tanto impedindo a proliferação e migração de células endoteliais, quanto na indução de sua apoptose, levando à inatividade tumoral (Van Moorselaar & Voest, 2002). O tratamento anti-angiogênico é de natureza citostática, e não citotóxica, o que implica que a terapia ocorra a longo prazo (Van Moorselaar & Voest, 2002). Diante da progressão neoplásica decorrente do recrutamento angiogênico, terapias anti-angiogênicas na idade avançada se mostram eficientes na inibição do processo tumorigênico (Montico et al., 2015).

O fator de crescimento transformador beta (TGF- β 1) é uma molécula da família das citocinas (Herpin, Lelong & Favrel, 2004) envolvida nos mecanismos de proliferação, apoptose, diferenciação e migração celular (Massagué, 2012). O peptídeo é conhecido por sua atuação controversa no processo de tumorigênese. No

crescimento normal dos tecidos e nos estágios primários de proliferação patogênica, atua como inibidor das divisões celulares atípicas (Guo & Kyprianou, 1998). Entretanto, quando o quadro de proliferação está mais avançado, o TGF- β 1 trabalha como promotor da proliferação destas células (Zhu & Kyprianou, 2005).

Uma sequência de eventos pró-tumorais é desencadeada em decorrência da desregulação na sinalização do TGF- β 1 (Cao & Kyprianou, 2015). Diante de tais evidências e da chamada “conversa cruzada” estabelecida entre os efetores de sinalização do TGF- β 1 e o eixo androgênico (Cao & Kyprianou, 2015), a sinalização desta molécula pode ser utilizada como alvo no tratamento de câncer de próstata resistente à castração, por exemplo (Jones, Pu & Kyprianou, 2009). Montico et al., (2015) observaram que a expressão de TGF- β sofre um aumento significativo na próstata de animais senis. O TGF- β está entre os fatores responsáveis pelo crescimento atípico da próstata durante o período de envelhecimento (Untergasser et al., 1999). O aumento da molécula nas células estromais é estimulado durante a senescência, promovendo maior proliferação. As células do músculo liso prostático também expressam TGF- β em grandes quantidades, sendo por este fator mediadas em proliferação e diferenciação (Huang & Lee, 2003). Além disso, os processos de diferenciação das células endoteliais, de formação e manutenção da parede dos vasos sanguíneos e de desenvolvimento das conexões vasculares em si são dependentes da regulação positiva desempenhada pelo TGF- β e seus receptores (Pepper, 1997). Este fator também regula a angiogênese tumoral, atuando como inibidor ou promotor, a depender do estágio da lesão (Pardali & Dijke, 2009). Desconsiderando as condições tumorais, o envelhecimento como fator isolado é caracterizado pelo aumento na expressão de TGF- β , como Zhou et al (1993) observou em seu estudo com células do baço envelhecidas. Dentre os eventos da senescência, ocorre a imunosenescência, uma descaracterização da função imune que torna o organismo mais susceptível ao desenvolvimento de doenças (Zhou et al., 1993). O TGF- β apresenta propriedades imunossupressoras atuando como mediador da resposta imune (Zhou et al., 1993; Ewers et al., 2008). O TGF- β está envolvido no desenvolvimento de doenças comumente associadas ao envelhecimento, como é o caso do câncer de próstata

(Kloss et al., 2018), o bócio senil, o hipertireoidismo (Lv et al., 2017), o Alzheimer, onde pode influenciar na expressão das lesões (Peress & Perillo, 1995) e a osteoporose (Fugita et al., 1990).

1.5. Maracujá-azedo e compostos bioativos

O maracujá-azedo (*Passiflora edulis*) pode ser encontrado em quase todo o território brasileiro e seu cultivo é favorecido pelo clima tropical (Wondracek, 2009). De modo geral, o fruto do maracujá em suas variedades comerciais contém um grande número de substâncias que promovem efeitos benéficos ao organismo (Zeraik et al., 2010). Os estudos evidenciam suas propriedades antioxidantes, capacidade de redução de hipertensão e das taxas de glicose e colesterol séricos (Zeraik et al., 2010). A farinha da casca do maracujá-azedo, por exemplo, tem sido estudada por suas propriedades hipoglicemiantes (Medeiros et al., 2009). Recentemente, Vuolo et al. (2020) demonstraram que a ingestão da farinha de casca de maracujá promoveu queda no estresse oxidativo através do aumento dos níveis de enzimas antioxidantes, atenuando a resposta inflamatória em homens com sobrepeso. O mesmo estudo constatou redução dos níveis séricos de insulina, da pressão arterial e da frequência cardíaca, bem como redução do ganho de peso corporal em 13,31% e a gordura corporal total em 22,58% de ratos obesos (Vuolo et al., 2020). Além disso, o uso do extrato da casca de três variedades de maracujá em ratos albinos, sobretudo com extrato do maracujá roxo, implicou em um efeito protetivo nos rins e no fígado destes animais (Nerdy & Ritarwan, 2019).

O maracujá também se apresenta como alimento funcional, pois é uma rica fonte de minerais e vitaminas, além de compostos fenólicos como alcaloides, flavonoides e carotenoides (Talcott et al., 2003; Zeraik et al., 2010). Os compostos fenólicos, de caráter natural ou sintético, são caracterizados pela união de um anel aromático com um grupo hidroxila. Quando estão em forma de polímeros, são chamados polifenóis e são capazes de promover atividade antioxidante (Angelo & Jorge, 2007). O consumo diário destes compostos na dieta pode promover um efeito protetivo de processos

oxidativos naturais do organismo (Degáspari & Waszczynskyj, 2004). Esta propriedade, a longo prazo, resulta na prevenção de doenças resultantes ou acentuadas pelos danos oxidativos como o câncer. Os processos oxidativos são desencadeados por formas extremamente reativas do oxigênio, as substâncias reativas oxigenadas, intimamente associadas ao processo de envelhecimento (Degáspari & Waszczynskyj, 2004). Desta forma, é possível obter efeitos preventivos e terapêuticos para o organismo em geral através do consumo frequente de alimentos vegetais, graças à presença de compostos bioativos como os polifenóis (Oczkowski et al., 2021).

A polpa do maracujá, mais comumente utilizada pela indústria, representa somente cerca de 30% de sua massa total, gerando o descarte de sementes, casca e fibras (Gerola et al., 2013; Viganó et al., 2016). Tais subprodutos industriais apresentam alto valor nutricional, sendo ricos em compostos polifenólicos, estes considerados excelentes antioxidantes (Martínez et al., 2012). As sementes do maracujá-azedo (*passiflora-edulis*) representam a porção do fruto com a maior concentração de compostos polifenólicos, como piceatannol (PIC) e scirpursina-B (Viganó et al., 2016). Outra vantagem nestes resíduos é seu baixo custo, fato que pode apresentar-se como alternativa de recurso nutricional para acesso de comunidades mais marginalizadas, ou como suplemento nutricional (Martínez et al., 2012). As sementes de maracujá-azedo também apresentam alto teor de ácidos graxos (Liu et al., 2009), com predominância de ácido linoléico (Ferrari et al., 2004). Assim sendo, classificar os subprodutos do maracujá como produtos adequados para utilização humana é um interesse não apenas econômico, mas também da ciência e da tecnologia (Ferrari et al., 2004; Zeraik et al., 2010). O fruto tem sido frequentemente explorado em pesquisas e na indústria farmacêutica (Coelho et al., 2016).

O PIC é um polifenol natural, classificado como estilbeno, encontrado em produtos vegetais como o maracujá, uva e o chá branco (Piotrowska et al., 2012; Kershaw & Kim, 2017). Esta substância é análoga ao hidroxilado do resveratrol, composto fenólico amplamente conhecido por suas propriedades benéficas à saúde (Piotrowska et al., 2012). Os efeitos antioxidantes do PIC em comparação ao resveratrol demonstraram maior potencial em cultura de células de linhagens leucêmicas (Ovesná

et al., 2006). Em relação ao resveratrol, o PIC desencadeia maior diferenciação de células-tronco neurais em astrócitos, de acordo com o estudo de Arai et al. (2016). Estes e outros dados apontam o PIC como um composto mais potente que o resveratrol em ensaios focados no combate ao câncer (Kukreja et al., 2014; Arai et al., 2016).

O PIC possui propriedades anti-inflamatórias, anticancerígenas, além de combater angiogênese, aterosclerose, hipercolesterolemia, hiperglicemia e problemas cardiovasculares (Kershaw & Kim, 2017). Seus mecanismos metabólicos começaram a ser estudados apenas recentemente (Kershaw & Kim, 2017). Em tumores mamários, o PIC demonstrou inibir a via angiogênica através de seus marcadores principais (fatores VEGF-A, VEGFR-2, VE-caderina, CD31), o que, com outros resultados, permite inferir que o composto age na supressão da progressão tumoral através de alterações no microambiente, reduzindo a expressão de fatores de transcrição como P-NF κ B p65, P-STAT3 e HIF-1 α e proteínas regulatórias da progressão do ciclo celular, além de reduzir a demanda de angiogênese e linfangiogênese (VEGF-C, LYVE-1) (Song et al., 2015).

Na próstata, o potencial quimiopreventivo do PIC se esteve relacionado prevenção do câncer de próstata, através de suas propriedades efetivas na inibição da síntese de andrógenos e da ativação dos receptores de andrógeno (Lundqvist et al., 2017). Em culturas celulares com células de câncer de próstata humano, o tratamento com PIC promoveu a apoptose e interrompeu o ciclo celular, além de atuar nas vias mitocondriais das células tumorigênicas, o que qualifica efeitos anticâncer (Kim et al., 2008; Kido et al., 2020). Foi observado que este composto fenólico ainda atuou como regulador da expressão de proteínas de migração e invasão nos tecidos prostáticos, através da inibição da sinalização de IL-6/STAT3 (Kwon et al., 2012). Recentemente, o estudo de Kido et al., (2020) demonstrou que o uso do extrato do bagaço do maracujá-azedo (EBM) rico em PIC, o mesmo utilizado no presente estudo, levou ao atraso da progressão de lesões proliferativas no modelo TRAMP. Esses achados indicaram um possível papel preventivo do EBM, e consequentemente, do PIC em relação ao câncer de próstata.

2. JUSTIFICATIVA

Com o aumento da expectativa e qualidade de vida, a população mundial de idosos aumentou significativamente e é esperado que esta tendência se mantenha nos próximos anos (Kanso, 2013). A Organização das Nações Unidas (ONU) divulgou em 2019 que a população mundial está envelhecendo. Já há mais idosos (pessoas acima de 65 anos) que crianças (de 1 a 4 anos), pela primeira vez na história. De acordo com as projeções, o quadro se agravará até 2050, quando haverá o dobro de idosos em relação às crianças (ONU, 2019). O Brasil também vem enfrentando o que chamamos processo de envelhecimento populacional. Este se dá principalmente pela queda nas taxas de fecundidade e consequente redução da porcentagem de jovens, somados ao aumento da expectativa de vida, configurando aumento da estrutura etária (Moreira, 2014).

O câncer de próstata foi o terceiro tipo de câncer mais comum em número de novos casos no último ano no mundo (1,414,259 novos casos, 7,3% do total de novos casos de câncer). As mortes em 2020 foram ao todo 305.304, representando 3,8% das mortes por câncer em geral (Sung et. al., 2021). Além disso, é o terceiro câncer mais letal na população mundial (Sung et al., 2021). Diante deste fato, sabe-se que o câncer de próstata, bem como outras desordens prostáticas são frequentes em indivíduos idosos e, por isso, merecem atenção. O desequilíbrio hormonal, associados a fatores genéticos e maus hábitos de vida, são alguns dos principais fatores que tornam os indivíduos senis mais suscetíveis a lesões na próstata (Prins et al., 2007).

Como consequência do processo de envelhecimento, processos naturais do organismo como angiogênese podem tornar-se continuamente estimulados criando condições favoráveis à proliferação celular e, consequentemente, à manutenção de um microambiente prostático com potencial tumoral. Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa demonstrou que durante o envelhecimento o aumento da angiogênese na próstata de camundongos foi capaz de promover mudanças morfofuncionais e moleculares, assemelhando-se à próstata de animais com câncer (Montico et al., 2014). Frente a isto, tratamentos anti-angiogênicos apresentaram importantes efeitos anti-

tumorais ao atenuar a formação de novos vasos sanguíneos no microambiente tumoral (Montico et al., 2014).

O uso de substâncias naturais oriundas de matrizes alimentares tem se tornado bastante comum no estudo da prevenção de doenças ou até mesmo em ensaios clínicos como adjuvantes em tratamentos quimioterápicos. Os compostos polifenólicos se destacam nesse contexto de prevenção de doenças, pois estão presentes em diferentes tipos de alimentos e suas características benéficas têm sido extensivamente caracterizadas e consideradas como promissoras, inclusive no câncer de próstata. O PIC é um polifenol que apresenta propriedades anti-proliferativas, anti-oxidantes, anti-angiogênicas e pró-apoptóticas e está presente no bagaço do maracujá-azedo. No entanto, não existem estudos que reportem a ação do EBM ou do PIC isolado no microambiente prostático senil. Assim sendo, o presente estudo se propôs a avaliar o uso do EBM rico em polifenóis, a fim de se verificar o potencial quimiopreventivo e um possível papel anti-angiogênico na próstata durante o envelhecimento.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar o microambiente prostático de camundongos senis submetidos à administração do extrato do bagaço do maracujá-azedo, através dos parâmetros morfológicos, hormonal e angiogênico.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar e quantificar características morfológicas da próstata ventral de camundongos jovens, senis e senis tratados com EBM;
- Caracterizar o perfil de resposta dos antígenos VEGF, VEGFR-2, TGF- β , CD31 e α -actina na próstata ventral dos diferentes grupos experimentais através da análise imunohistoquímica;
- Quantificar através da técnica de Western-Blotting o nível proteico dos antígenos VEGF, AR, TGF- β , ER- α e α -actina presente na próstata ventral dos diferentes grupos experimentais;
- Avaliar qualitativamente a histopatologia do fígado nos diferentes grupos experimentais, a fim de determinar os efeitos da administração do EBM sobre o tecido hepático.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Extrato do bagaço do maracujá

A obtenção e análise química do extrato do bagaço do maracujá foi previamente realizada em parceria com o Laboratório de Nutrição e Metabolismo, sob responsabilidade do Prof. Dr. Mário R. Maróstica Júnior. O extrato desengordurado, obtido a partir de sementes e remanescentes de polpa de maracujá-azedo, foi obtido por meio de extração com líquido pressurizado. A caracterização química do extrato (análise de compostos fenólicos totais e específicos), bem como a quantificação do conteúdo de PIC e avaliação de capacidade antioxidante foi realizada previamente pelo grupo do Prof. Maróstica e os dados foram utilizados para determinar a dose do presente estudo (Baseggio et al., 2021).

4.2. Protocolo Experimental *in vivo*

4.2.1. Animais e Procedimento Experimental

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Biologia, Unicamp, e consta sob o protocolo de nº 4977-1/2018. Foram utilizados 45 camundongos machos da linhagem FVB, 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.

Os animais obtidos foram divididos em 3 grupos experimentais:

- a. Grupo Controle JOVEM (JV): Camundongos FVB com 12 semanas de idade (n=15) receberam água (veículo) por gavagem, durante 10 semanas;

- b. Grupo Controle SENIL (SC): Camundongos FVB com 52 semanas (n=15) receberam água por gavagem, durante 10 semanas;
- c. Grupo SENIL / Extrato do bagaço do maracujá (SM): Camundongos FVB com 52 semanas de idade (n=15) receberam por gavagem dose equivalente a 10 mg/Kg de PIC contido no EBM na forma aquosa pelo período de 10 semanas (Adaptado de Song et al., 2015).

Durante 10 semanas precedentes à eutanásia, todos os animais foram pesados semanalmente em balança analítica, bem como a ração disponibilizada correspondente aos mesmos, a fim de calcular o consumo de ração e ganho de peso. Ao término do tratamento, todos os animais foram pesados em balança analítica, anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (5mg/kg i.m.; König, São Paulo, Brasil) e Cloridrato de Cetamina 10% (60mg/kg, i.m.; Fort Dodge, Iowa, EUA) e eutanasiados.

Amostras do lobo ventral e do fígado foram coletadas de todos animais de cada grupo experimental, e submetidas às análises morfológicas e morfométricas em microscopia de luz, análise imunohistoquímica e de western blotting (Fig. 1).

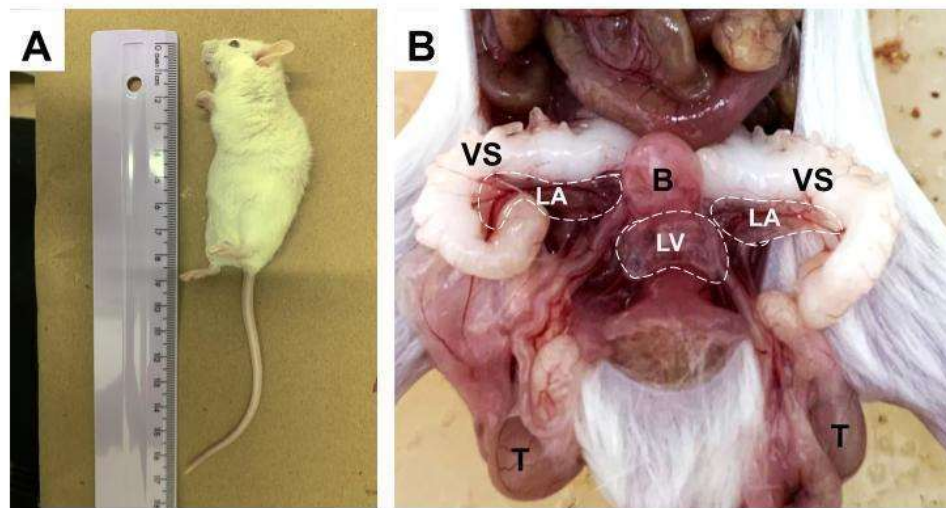


Figura 1: Fotografias de camundongos FVB. (A) Medida relativa do camundongo em centímetros. (B) Aparelho reprodutor exposto através de incisão ventral em “v”, permitindo visualização da bexiga (B), vesículas seminais (VS), testículos (T) e lobos prostáticos ventrais (LV) e anteriores/glândula de coagulação (LA). Aumento 12,5x

4.2.2. Microscopia de luz

Após a coleta, amostras da próstata ventral e do fígado foram fixadas em Bouin por 24 horas e, posteriormente, foram lavados em etanol 70% por 3 semanas. Em seguida, todas as amostras foram desidratadas em uma série crescente de álcoois, diafanizados em xilol por 2 horas e embebidos em parafina contendo polímeros plásticos (Paraplast, Merck). Os blocos contendo amostras da próstata ventral e fígado foram seccionados na espessura de 5µm e 8µm, respectivamente, utilizando micrótomo Hyrax M60 (Zeiss, Munique, Alemanha) .

4.2.2.1. Análise morfológica e morfométrica da próstata

As lâminas teciduais utilizadas para análise morfológica da próstata ventral dos diferentes grupos experimentais foram coradas tanto em hematoxilina e eosina como em tricrômico de masson, e as fotomicrografias capturadas com o fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400 - Nikon, Tokyo, Japão) através de software NIS-Elements/Image. Um retículo com 420 intersecções foi projetado, individualmente, sobre 10 imagens aleatórias capturadas com objetiva de 40x, para cada animal utilizando software Image Pro-Plus. Para cada imagem analisada foram discriminadas as seguintes categorias: epitélio normal, NIP, epitélio atrófico, epitélio total, lúmen acinar, estroma total e camada fibromuscular ao redor do ácino. O percentual de cada um dos itens avaliados foi determinado considerando-se o número total de pontos por imagem. Microácinos e focos de adenocarcinoma bem diferenciado foram quantificados em 10 campos aleatórios capturados com objetiva de 40x para cada animal.

4.2.3. Imunohistoquímica

Amostras prostáticas de 5 animais de cada grupo experimental, os mesmos utilizados para a microscopia de luz, foram utilizadas para as imunomarcações, adaptando a metodologia descrita por Kido et al., (2016).

As lâminas contendo amostras do tecido prostático passaram pelo processo de recuperação antigênica através de aquecimento em solução tampão de citrato, de 2 a 5 ciclos de 5 minutos a depender do antígeno. Alguns antígenos (VEGF e VEGFR-2) exigiram uma permanência de 15 minutos no tampão após 4 ciclos de 5 minutos. Após 3 lavagens de 5 minutos com solução basal, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio de 0,1 a 0,3%. Após nova sequência de lavagens de (3x5min), o bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com solução de 1 a 3% de BSA (albumina do soro bovino) por 1 hora. As amostras em lâminas foram lavadas por mais 3x5min em solução basal, para então serem incubadas com os anticorpos primários: anti- α -actina ab5694 (Abcam), anti-CD31 sc-1506 (Santa Cruz), anti-VEGF sc-53462 (Santa Cruz), anti-VEGFR-2 sc-315 (Santa Cruz) e anti-TGF- β ab64715 (Abcam). Em seguida, as lâminas foram levadas à geladeira overnight. No dia seguinte, as amostras foram novamente lavadas em solução basal (6x5min) e incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse (W4021/promega), ou anti-rabbit (W4018/promega), os quais foram diluídos em BSA 1%. Todas as diluições e informações sobre os anticorpos estão descritas na Tabela 1.

As lâminas então foram reveladas em DAB (3,3'-diaminobenzidina) até os tecidos apresentarem cor acastanhada. Este método confirmou a imunolocalização das proteínas de interesse no tecido prostático. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina e montadas para microscopia de luz. A avaliação da imunoreatividade dos antígenos marcados ocorreu através da comparação a um controle negativo realizado através da incubação de lâmina amostral sem anticorpo primário. A presença da imunoreatividade foi determinada a partir da análise de 10 campos não sobrepostos por animal, capturados com objetiva de 40x, sobre os quais foi posto um retículo com 420 pontos. Destes pontos, foi calculada a porcentagem daqueles que coincidem com áreas positivas para a reação imunohistoquímica na fotomicrografia. Nas lâminas submetidas a imunohistoquímica para a molécula CD31, foi avaliada a densidade de microvasos, calculada pelo número absoluto de vasos imunorreativos em cada um dos 10 campos de captura.

Tabela 1: Anticorpos primários e secundários e diluições utilizadas na técnica de imunohistoquímica.

	Código/Marca		Diluição
Anticorpos Primários	α -actina	ab5694 / abcam	1:35
	CD31	sc-1506 / santa cruz	1:500
	VEGF	sc-53462 / santa cruz	1:35
	VEGFR-2	sc-315 / santa cruz	1:35
	TGF β -1	ab64715 / abcam	1:50
Anticorpos Secundários	Rabbit	kit abcam	solução pronta
	Mouse	kit abcam	solução pronta
	Rabbit	W4018 / promega	1:100 (TGF- β)
	Mouse	W4021 / promega	1:300 (α -actina)

4.2.4. Western Blotting

Amostras do lobo ventral foram coletadas de pelo menos 5 animais de cada grupo experimental e congeladas a -80°C . Para a extração de proteínas foi utilizado tampão de lise não denaturante e 1% de aprotinina para bloqueio de proteases. As amostras então foram homogeneizadas utilizando sonicador (Vibra Cell, Sonics) e, em seguida, centrifugadas a 14000 rpm a 4°C por 20 minutos para coleta do sobrenadante.

A dosagem de proteínas totais das amostras prostáticas foi realizada pelo método de Bradford. Posteriormente, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli e aquecidas em banho-seco a 100°C por 5 minutos. O correspondente a 20 μg de proteína

foi utilizado para cada amostra, as quais foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (10% - 30V). Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente (Sistema Hoefer) para membranas de nitrocelulose (Amersham) a 100 V (90-120 minutos). Após transferência, as membranas foram submetidas a bloqueio em leite 5%, por 1 hora. A incubação do anticorpo primário foi efetuada e as membranas foram mantidas no agitador *overnight* a 8°C . Então, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário por 2 horas a temperatura ambiente, lavadas com solução basal (6x5min) e, por fim, reveladas em solução quimioluminescente (Super Signal West Pico Chemiluminescent - Thermo Scientific -34080). As bandas foram capturadas pelo equipamento G-BOX (Syngene, Cambridge, UK) e quantificadas pelo software UNScan-it. β -actina foi utilizada como controle endógeno e todas as membranas foram submetidas a stripping. Os anticorpos e diluições utilizados nos experimentos encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Anticorpos primários e secundários e diluições utilizadas nas técnicas de western blotting.

	Código/Marca		Diluição
Anticorpos Primários	α -actina	ab-5694 / abcam	1:100
	VEGF	sc-53462 / santa cruz	1:250
	ER- α	sc-71064 / santa cruz	1:350
	TGF β -1	ab64715 / abcam	1:500
	AR	sc-816 / santa cruz	1:350
	β -actina	sc-81178 / santa cruz	1:5000
Anticorpos Secundários	Rabbit	W4018 / promega	1:5000
	Mouse	W4021 / promega	1:5000

4.2.5. Análise Histopatológica do Fígado

As lâminas contendo amostras do tecido hepático foram coradas em hematoxilina-eosina e as fotomicrografias capturadas com o fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400 - Nikon, Tokyo, Japão) e o software NIS-Elements/Image. Foram capturados 10 campos não sobrepostos por animal na objetiva de 40x. Análise qualitativa foi empregada a fim de descrever o padrão observado nos hepatócitos e meio extracelular nos diferentes grupos experimentais.

4.2.6. Análise Estatística

Os resultados obtidos nas técnicas utilizadas no presente trabalho foram submetidos a testes estatísticos, os quais consistiram em pré-teste de normalidade de Shapiro-Wilk, o teste ANOVA, seguido por pós-teste de Dunnet, para dados paramétricos, ou pós-teste de Kruskal-Wallis, para dados não paramétricos. O software utilizado para a realização dos testes foi GraphPad Prism e a significância considerada foi de * $p < 0,05$ %, ** $p < 0,01$ % e *** $p < 0,0001$ %.

5. RESULTADOS

5.1. Ganho Absoluto de Peso Corporal e Consumo de Ração

O consumo médio de ração diário e o ganho de peso corporal reduziram significativamente após o tratamento com EBM em relação ao grupo controle SC (Fig. 2A-B). Enquanto que entre os grupos controle JV e SC, não houve diferença estatisticamente significativa (Fig. 2A-B).

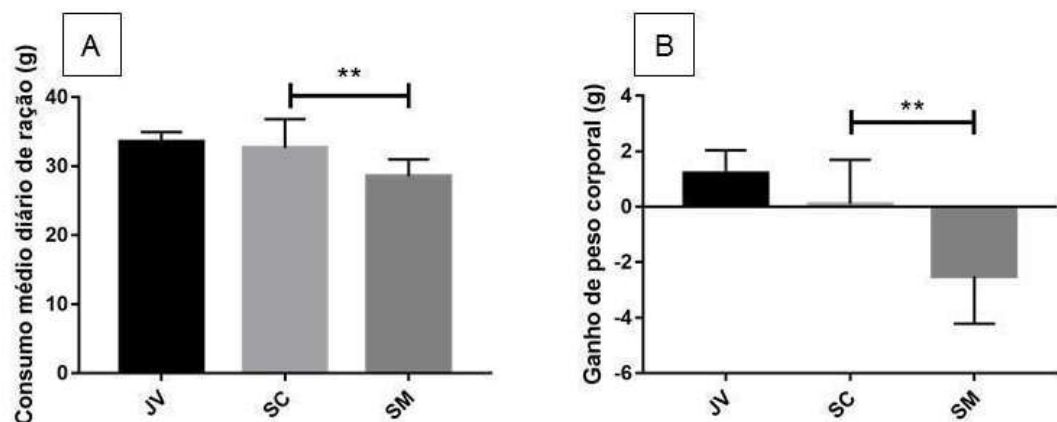


Figura 2. (A) Consumo médio diário de ração. (B) Ganho absoluto de peso. Diferença estatisticamente significativa em (A) entre os grupos SC e SM e (B) entre os grupos SC e SM. * $p < 0.05\%$, ANOVA One-way seguido pelo teste de Dunnett, considerando: * $p < 0,05\%$ e ** $p < 0,01\%$ (comparação com o grupo controle SC).

5.2. Histopatologia e Morfometria da Próstata

5.2.1. Grupo Jovem (JV)

A próstata ventral dos animais do grupo jovem (Fig. 3, A-D; 4, A-C) caracterizou-se pela presença de epitélio do tipo simples, o qual delimita o lúmen e o separa do

estroma, formando estruturas isoladas denominadas ácinos prostáticos. Células epiteliais secretoras foram identificadas com formato variando de colunar a cúbico e com núcleo basal. Além disso, células basais foram observadas de forma esparsa intercaladas às células epiteliais secretoras (Fig. 3C; 4A). A avaliação morfométrica confirmou maior incidência de área correspondente a epitélio saudável em animais do grupo JV, quando comparada ao grupo SC (Fig. 5B). O estroma prostático caracterizou-se por aspecto fibrocelular com espessura delgada composto por camadas de células musculares lisas e elementos fibrilares distribuídos de forma concêntrica ao redor dos ácinos glandulares. (Fig. 3 A-D; 4 A-C),

5.2.2. Grupo Controle Senil (SC)

A próstata ventral dos camundongos senis foi caracterizada pela presença de alterações tanto no compartimento epitelial quanto estromal (Fig 3 E-H; Fig. 4 D-F). Redução significativa de áreas de epitélio saudável (Fig. 5B), aumento significativo da incidência de atrofia epitelial (Fig. 5C) e presença de microácinos (Fig. 3F; 4F) foram características observadas na próstata dos animais senis quando comparadas a próstata ventral de animais do grupo JV (Fig). Ainda, foram identificadas lesões proliferativas como NIP, um tipo de lesão não-invasiva da próstata, definida pela estratificação do epitélio glandular, atipia nuclear e/ou palidez (Fig. 3, E,F,H; Fig. 4H). Também, eventuais focos de adenocarcinoma bem diferenciado, lesão maligna caracterizada pela descontinuidade da membrana basal e invasão de células epiteliais no compartimento estromal (Fig. 4D).

O estroma prostático apresentou focos de hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas, os quais apresentaram-se significativamente aumentados em relação ao grupo jovem (Fig. 5F). Essas alterações geralmente foram identificadas adjacentes a áreas de lesões epiteliais (Fig 4. D,F). Além disso, focos de células inflamatórias foram identificados no estroma prostático adjacente a áreas de lesão ou microácinos (Fig 4.F)

5.2.3. Grupo Senil tratado com Extrato do Bagaço de Maracujá (SM)

A próstata ventral do grupo tratado com o EBM apresentou melhora dos aspectos estruturais quando avaliados de forma qualitativa em relação ao grupo SC (Fig 3. I-L; 4G-I). De maneira geral, o compartimento epitelial demonstrou aspecto semelhante ao grupo JV, caracterizando-se pela presença de epitélio secretor simples de formato colunar e cúbico e núcleo de orientação basal (Fig. 3 A-D; I-L; 4 G-I). Áreas de epitélio atrófico e NIP ainda foram observados neste grupo (Fig. 3K), porém, a análise morfométrica não indicou diferença na incidência dessas lesões induzida pelo EMB quando comparado ao grupo SC (Fig. 5C, D). Ainda, aumento significativo da área total correspondente ao estroma foi verificado na próstata ventral dos animais que receberam EBM em relação aos demais grupos experimentais (Fig. 5E).

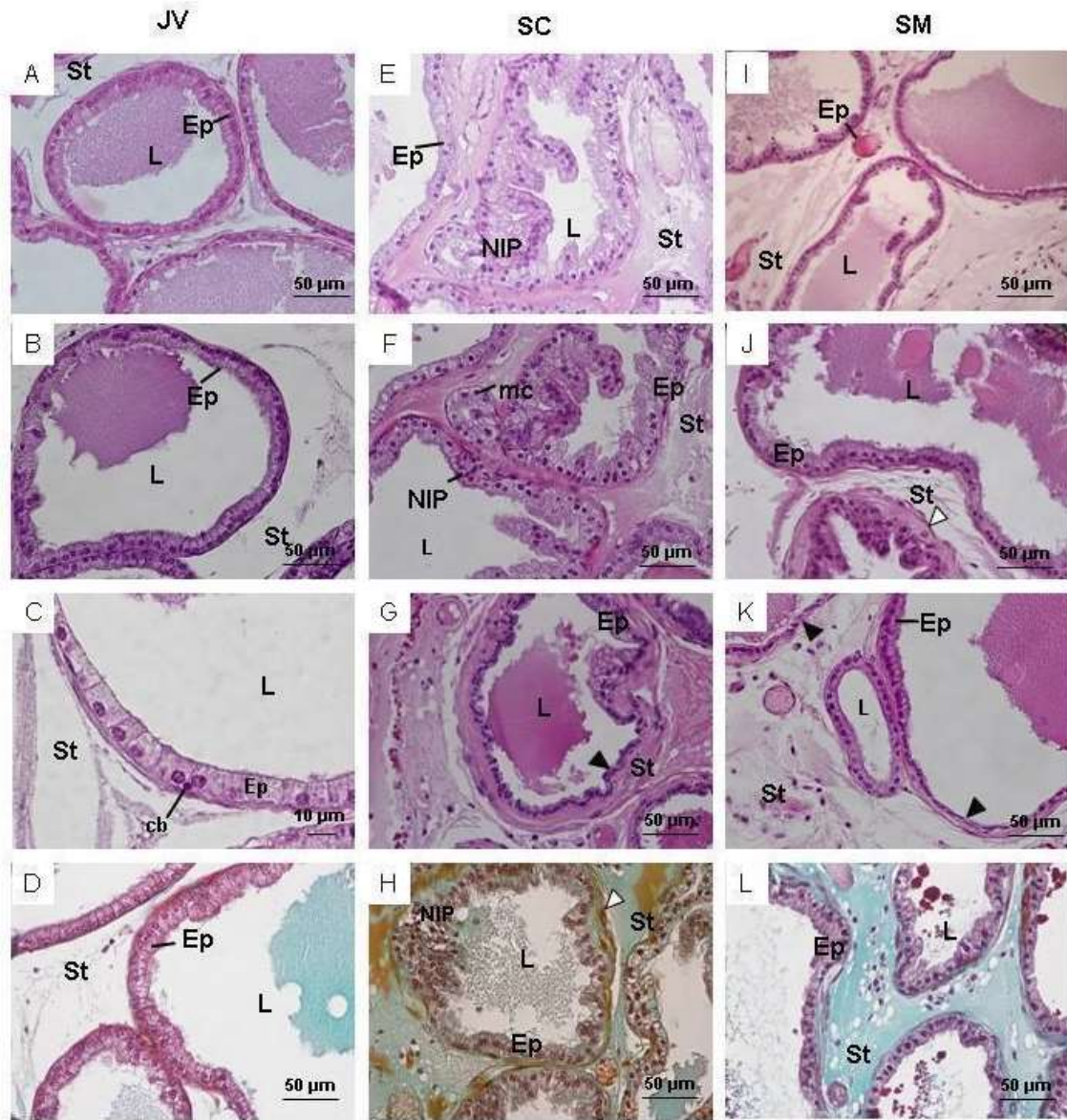


Figura 3: Fotomicrografias do lobo ventral da próstata de camundongos FVB. **GRUPO JV- (A-D):** epitélio secretor simples, com células luminais e basais (cb). Estroma fibromuscular de aspecto normal e delgado. **GRUPO SC (E-H):** Focos de proliferação do epitélio glandular classificados como neoplasia intraepitelial prostática (NIP), foco de atrofia (cabeça de seta) e presença de microácino (mc). **(G)** Estroma fibromuscular hiperplásico e hipertrófico. **(H)**, detalhe para foco de proliferação epitelial (NIP) e espessamento da camada de células musculares lisas (cabeça de seta branca). **GRUPO SM - (I-L):** epitélio secretor simples, com células cúbicas a colunares e focos de atrofia epitelial (cabeça de seta). Estroma prostático de aspecto normal

com eventuais pontos de hipertrofia das células musculares lisas (cabeça de seta branca). JV: jovem; SC: senil; SM: senil tratado com extrato do bagaço do maracujá; Ep: epitélio; St, estroma; L: lúmen; cb (célula basal). Hematoxilina-Eosina (A-C; B-G; I-K); Tricrômico de Masson (D, H, L).

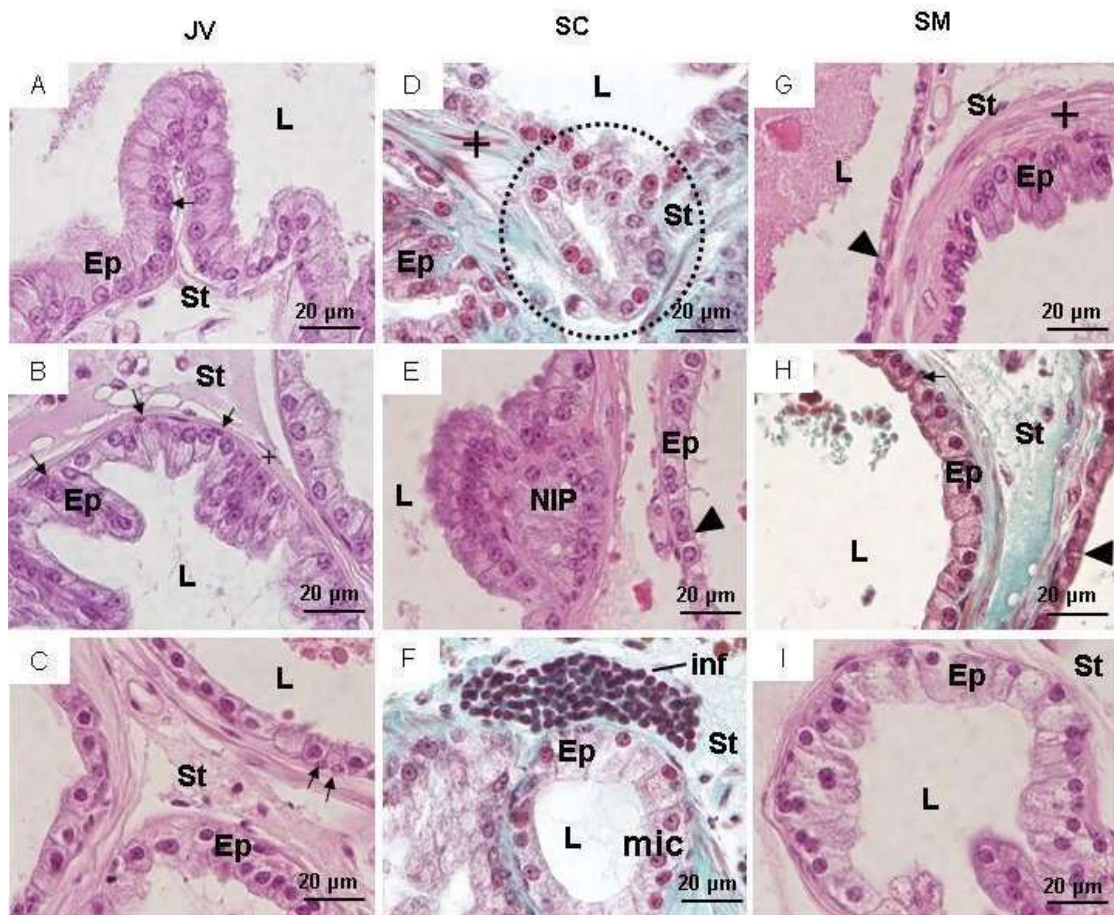


Figura 4: Fotomicrografias da próstata ventral de camundongos FVB. **(A-C)** Grupo JV: células basais do epitélio (setas) e delgada camada fibromuscular. **(D-F)** Grupo SC: neoplasia intraepitelial prostática (NIP) em E e F, microácino (mic), atrofia epitélio-glandular (cabeça de seta), infiltrado inflamatório (inf) e adenocarcinoma bem diferenciado (círculo descontinuo) e camada fibromuscular espessa (+). **(G-I)** Grupo SM: camada fibromuscular espessa (+) e região de atrofia (cabeça de seta). JV: jovem; SC: senil; SM: senil tratado com extrato do bagaço do

maracujá; Ep: epitélio; St, estroma; L: lúmen. Hematoxilina-Eosina (A, B, C, E, G, I); Tricrômico de Masson (D, F, H).

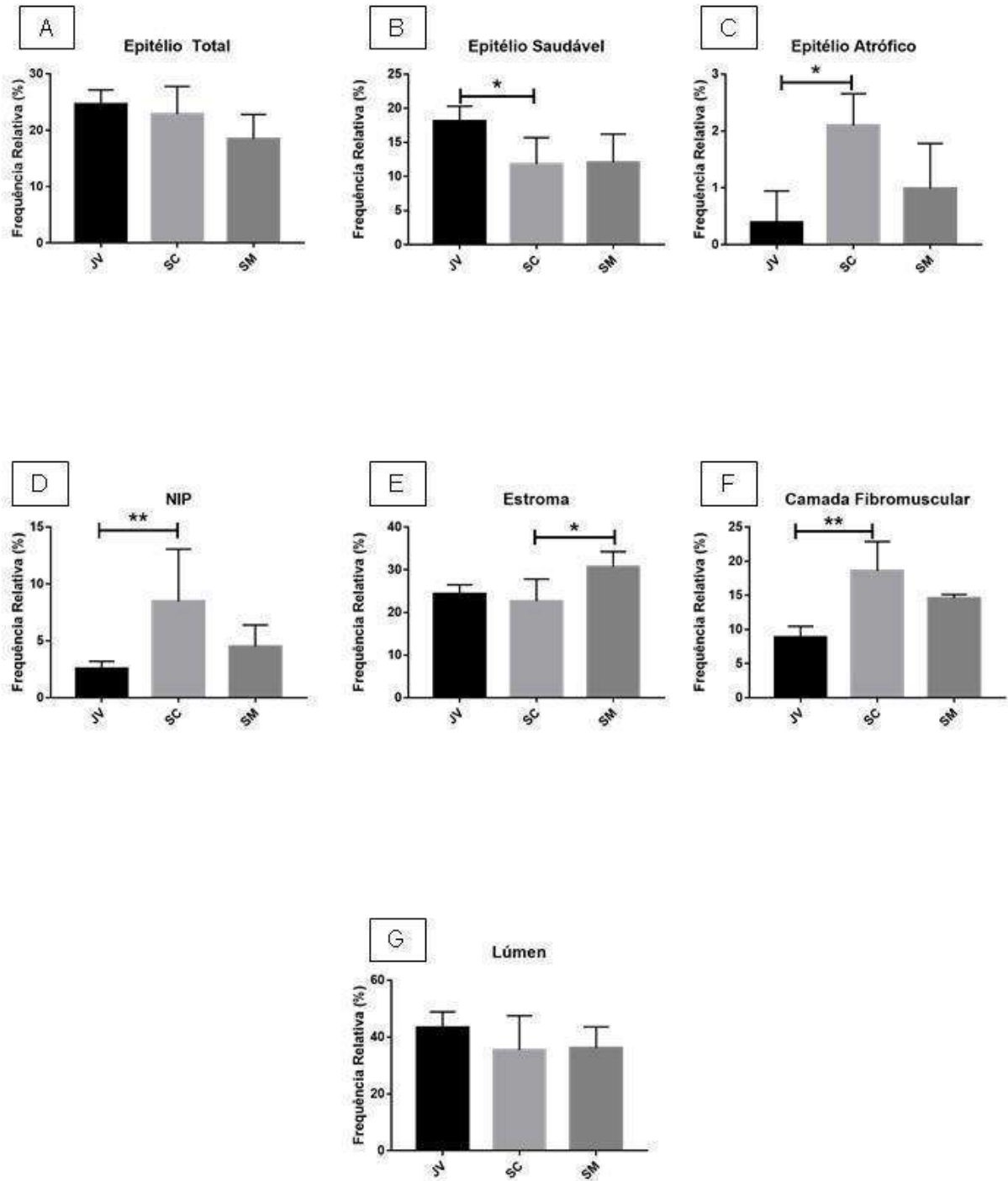


Figura 5: Análise morfométrica do lobo ventral da próstata de camundongos FVB dos grupos JV, SC e SM. (A) Epitélio total. (B) Epitélio Saudável. (C) Epitélio atrofico. (D) Neoplasia Intraepitelial Prostática. (E) Estroma. (F) Camada Fibromuscular. (G) Lúmen glandular total. JV: jovem; SC: senil; SM: senil tratado com extrato do bagaço do maracujá. Ep: epitélio; St, estroma; L: lúmen. Teste estatístico One-Way ANOVA, seguido do pós teste de Dunnet, considerando * $p < 0,05\%$; ** $p < 0,01\%$ **** $p < 0,0001\%$. JV: jovem; SN: senil; SM: senil tratado com extrato do bagaço do maracujá.

5.3. Análise Histopatológica do Fígado

A morfologia do fígado dos animais do grupo JV foi caracterizada pela presença de hepatócitos de forma poligonal, mono ou binucleado (Fig. 6A). Os hepatócitos apresentaram-se dispostos em cordões em regiões de anastomose todos provenientes das veias porta e centrolobular e da artéria hepática e delimitados por células endoteliais (Fig. 6B). Em continuação com o contorno da veia centrolobular, observa-se o início de um cordão de hepatócitos (Fig. 6B)

No grupo SC, a presença de acúmulo de conteúdo citoplasmático ao redor dos núcleos dos hepatócitos foi observada, os quais também variaram entre mono e binucleados. Os vasos sanguíneos interpostos no tecido hepático, na matriz extracelular, apresentaram camada fibromuscular aparentemente mais espessa em relação ao grupo JV (Fig 6E). Além disso, foi identificado focos de infiltrados inflamatórios (Fig. 6D).

O tratamento experimental com EBM não promoveu alterações morfológicas evidentes no fígado dos animais senis quando comparado ao grupo controle SC (Fig. 6C e 6F).

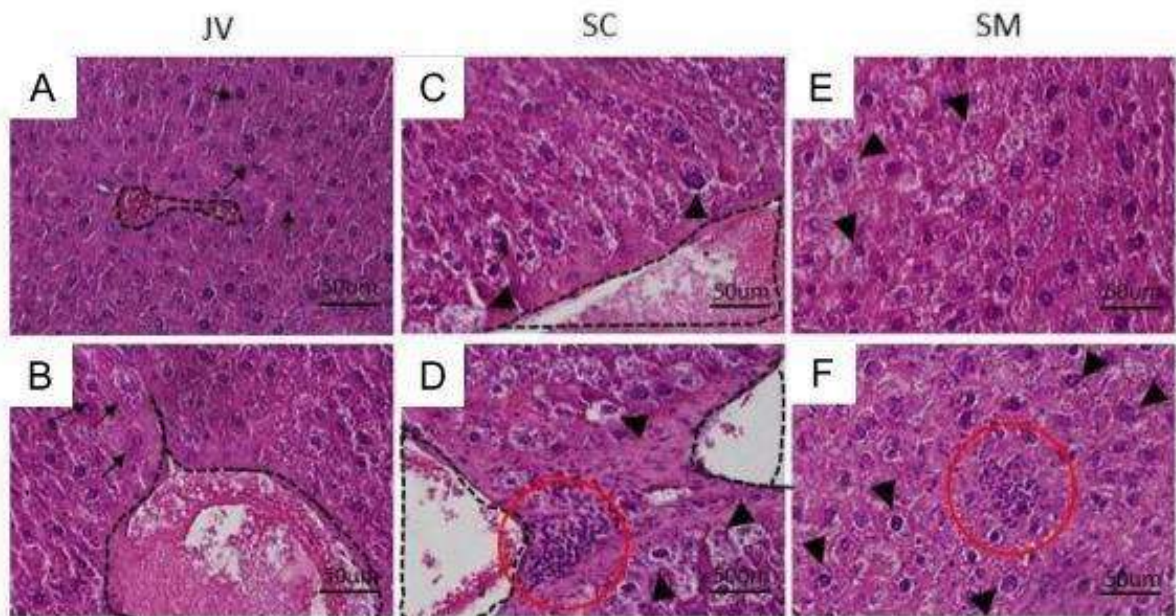


Figura 6: Tecido hepático dos diferentes grupos experimentais, JV (A e B), SC (C e D) e SM (E e F). Hepatócitos (setas), hepatócitos de núcleo e citoplasma de volume aumentado (cabeças de seta) e veia centrolobular do fígado (contorno), e presença de infiltrado inflamatório (círculo vermelho). Coloração em H.E.

5.4. Análise Imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica indicou aumento significativo da imunoreatividade α -actina no grupo SC em relação ao grupo JV (Fig. 7A, B; 8A), confirmando o aumento significativo da camada fibromuscular nos animais senis observados na análise morfométrica. Já o grupo tratado com EBM não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle SC (Fig. 7C, 8A).

Os animais do grupo SC também apresentaram aumento significativo na imunomarcagem de CD31, VEGF e VEGFR-2 em relação aos animais jovens, indicando aumento do processo de angiogênese associado ao processo de envelhecimento (Fig. 7D, E, G, H, J, K; 8B-D). O tratamento com EBM diminuiu significativamente o número de vasos marcados pelo antígeno CD31 (Fig. 7E, F; 8B), e a imunoreatividade do

VGFR-2 (Fig. 7K, L; 8B), enquanto que as demais moléculas não apresentaram alterações quando comparado ao grupo controle SC (Fig. 7H, I; 8, C). Todos os antígenos analisados apresentaram reatividade localizada no citoplasma das células.

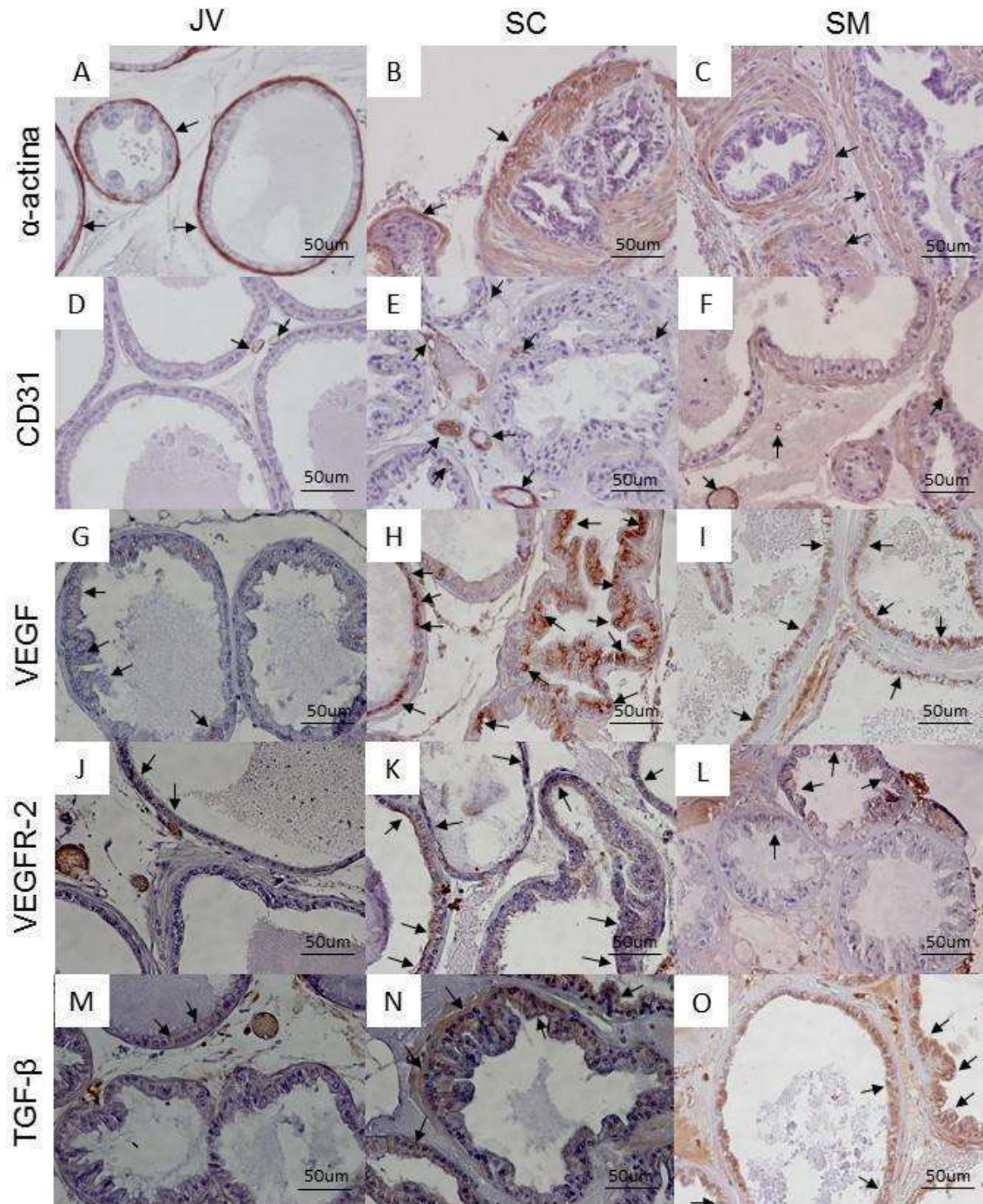


Figura 7. Imunomarcação dos antígenos α -actina (**A-C**), CD31 (**D-F**), VEGF (**G-I**), VEGFR-2 (**J-L**) e TGF- β (**M-O**), no lobo ventral da próstata de camundongos FVB. JV: jovem; SC: senil; SM: senil tratado com extrato do bagaço do maracujá. Contracoloração em Hematoxilina. As setas indicam a imunoreatividade positiva dos antígenos.

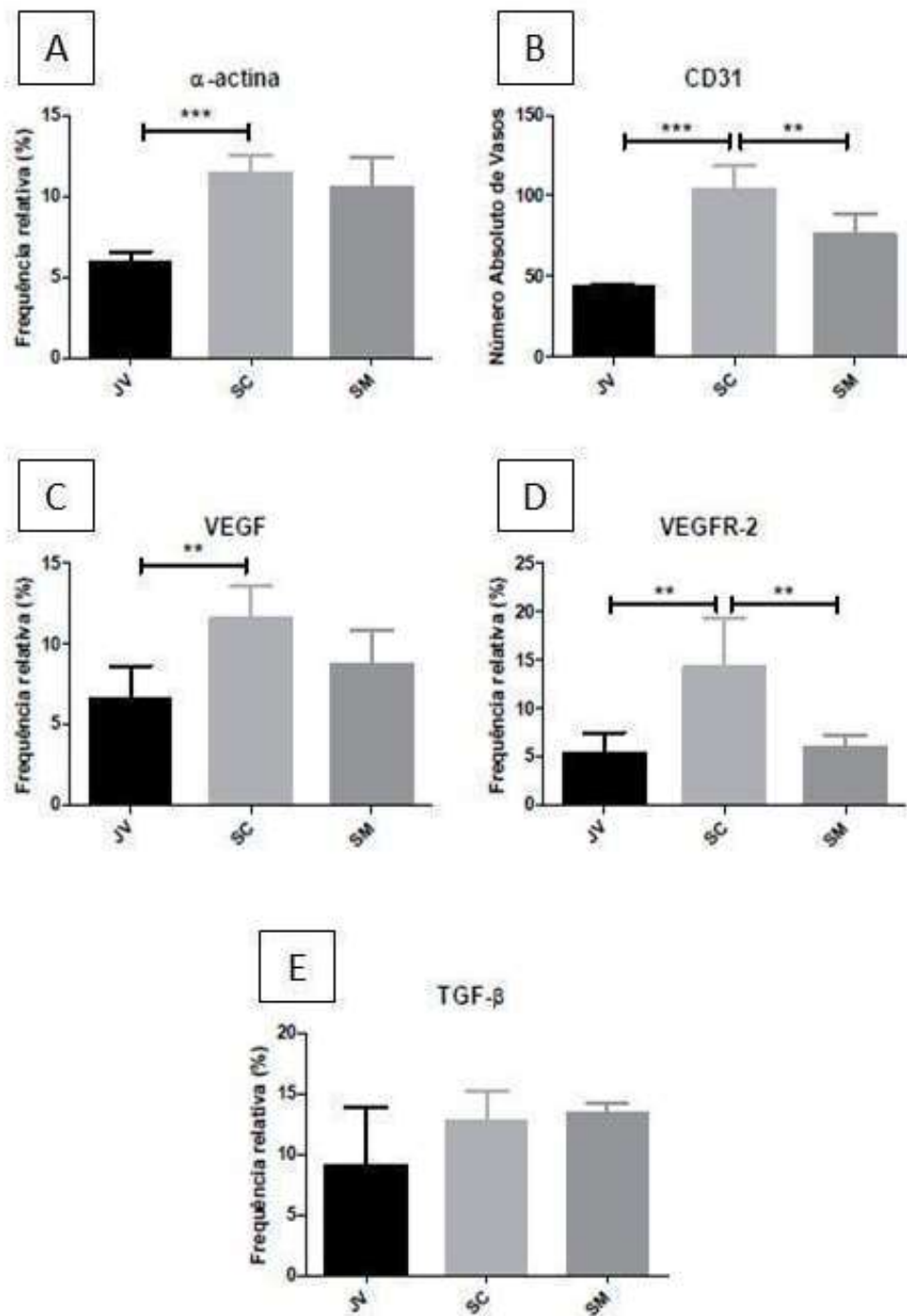


Figura 8. Frequência relativa da imunomarcação de α -actina (A), CD31 (B), VEGF (C), VEGFR-2 (D) e TGF- β (E) no lobo ventral da próstata de camundongos FVB. Teste estatístico One-Way

ANOVA, seguido do pós teste de Dunnet, considerando * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.
JV: jovem; SN: senil; SM: senil tratado com extrato do bagaço do maracujá.

5.5. Western Blotting

Os níveis proteicos de α -actina no lobo ventral da próstata apresentaram apenas aumento no grupo controle SC em relação ao grupo JV (Fig 9A). Assim como na análise de imunohistoquímica, aumento significativo dos níveis proteicos de VEGF (Fig. 9B) e TGF- β (Fig 9C) foram também observados no grupo SC quando comparado ao grupo JV. O tratamento com EBM não promoveu redução significativa na expressão de VEGF e TGF- β em relação ao grupo controle SC (Fig. 9B, C), seguindo a tendência dos resultados apontados na imunohistoquímica.

Em relação aos níveis de receptores hormonais analisados, foi observado aumento de ER- α no grupo SC em relação ao grupo JV.(Fig. 9D). Enquanto que nos animais que receberam EBM aumento significativo de AR e diminuição de ER- α foram identificados quando comparado ao grupo controle SC (Fig. 9E, D).

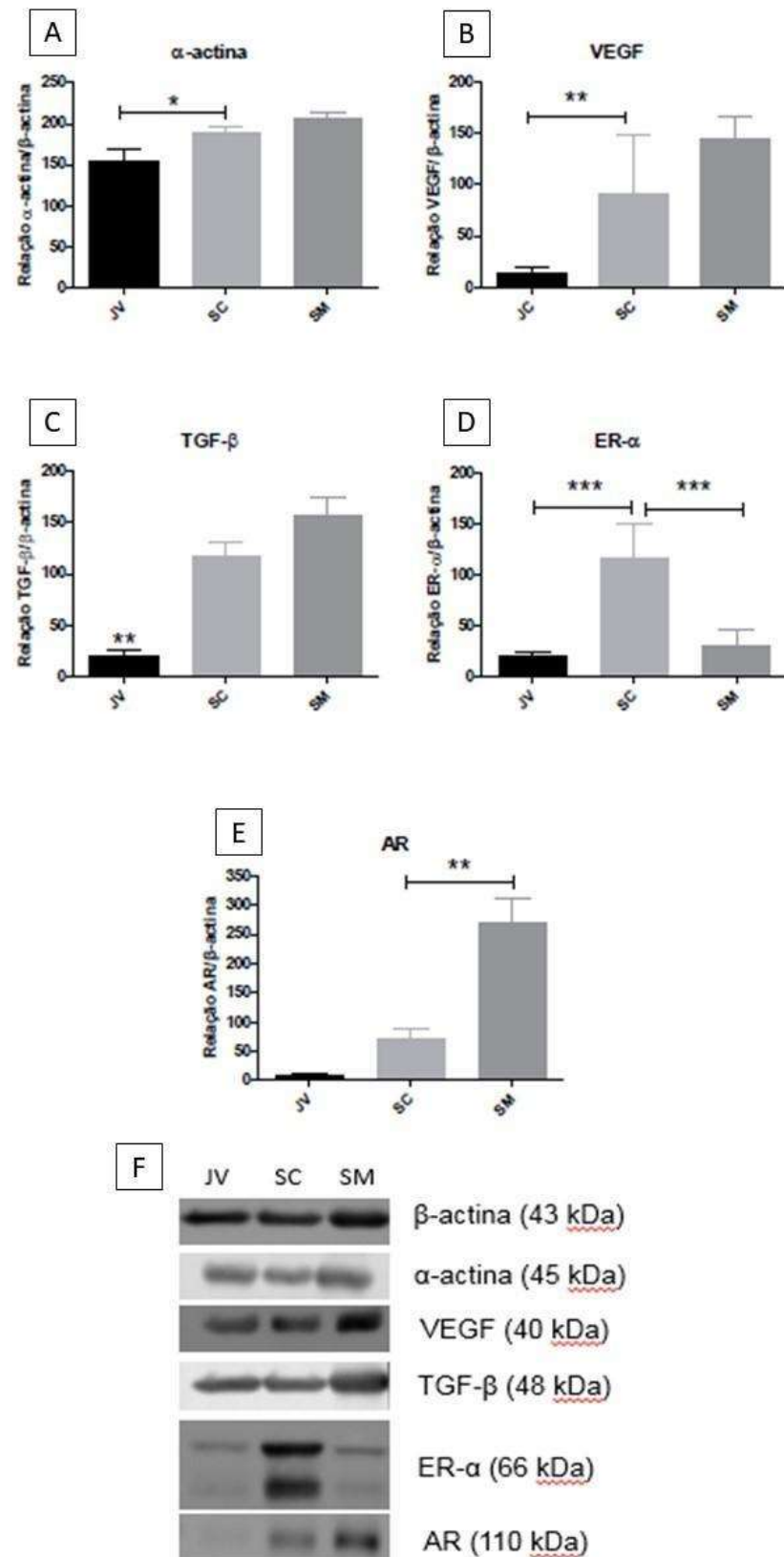


Figura 9. Quantificação dos níveis proteicos para as diferentes moléculas avaliadas: **(A)** α -actina, **(B)** VEGF, **(C)** TGF- β , **(D)** ER- α e **(E)** AR. Membranas representativas indicando o efeito do EBM na próstata ventral de animais senis **(F)**. Teste estatístico One-Way ANOVA, seguido de Dunnet's, considerando $p < 0,05\%$ para significância estatística, considerando * $p < 0,05\%$; ** $p < 0,01\%$ **** $p < 0,0001\%$. JV: jovem; SN: senil; SM: senil tratado com extrato do bagaço do maracujá.

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo confirmaram que o processo de envelhecimento é causador de alterações morfofuncionais deletérias no microambiente prostático. Além disso, nossos dados demonstraram que tais modificações também estão associadas ao aumento do processo angiogênico e desequilíbrio hormonal. O tratamento com EBM, em animais idosos, não atenuou completamente os indicadores morfológicos característicos do envelhecimento na próstata ventral e, ainda, induziu aumento da área correspondente ao compartimento estromal, indicando possível processo de remodelação estrutural após o uso do extrato. Ainda, efeitos sistêmicos do uso do extrato foram observados, indicando seu papel na modulação do metabolismo energético. Diferentemente da hipótese inicial, o uso do EBM não induziu a uma resposta anti-angiogênica completa na próstata de animais senis. Contudo, o tratamento com EBM alterou a sinalização hormonal diminuindo os níveis de ER- α , um importante indicador e indutor de lesões na próstata, inflamação e surgimento do câncer associado ao envelhecimento, e aumentou os níveis AR, sugerindo uma resposta pró androgênica frente ao desequilíbrio hormonal próprio desta fase da vida.

É característica de animais idosos a presença de lesões prostáticas como a proliferação alterada do epitélio, atrofia epitelial, núcleos atípicos no epitélio secretor e eventuais microácinos derivados do epitélio principal (Montico et al., 2014). Outras alterações comuns observadas no processo de envelhecimento são redução da proporção das áreas de epitélio saudável em relação às áreas de epitélio atrófico, e presença de lesões como o adenocarcinoma bem diferenciado (Lamas et al., 2020). O estudo de Kido et al. (2017), também observou a ocorrência de inflamação, níveis plasmáticos aumentados de IL1- β , e lesões neoplásicas com maior frequência durante o envelhecimento no mesmo modelo animal utilizado no presente estudo. Tais características também são comuns em amostras prostáticas de pacientes idosos com HPB, e estão associadas ao enfraquecimento e aumento permeabilidade da barreira epitelial (Pascal et al., 2021). Esta condição fisiológica pode estimular um quadro crônico de resposta inflamatória no microambiente prostático, assim como potencializar o surgimento de neoplasias e metástases (Pascal et al., 2021). Além disso, as

alterações estromais observadas no presente estudo refletiram diretamente no aumento da imunoeexpressão de α -actina de músculo liso, confirmando achados previamente descritos na literatura, os quais atestam que o aumento do volume glandular prostático de origem predominantemente estromal como característica recorrente no envelhecimento (Zanetoni, 2002; Bianchi-Frias et al., 2010; Liu et al., 2019). Em conjunto, as alterações morfológicas observadas no presente estudo no modelo senil, em ambos compartimentos glandulares, corroboram que envelhecimento contribui para o surgimento de disfunções prostáticas, sejam elas de origem inflamatória ou neoplásica.

Diferente do esperado, a ingestão EBM não foi capaz de alterar significativamente a estrutura prostática dos animais senis, contudo, também não foi observado piora drástica desses parâmetros. Dados recentes da literatura mostraram que o tratamento com EBM atrasou o agravamento das lesões na próstata, levando ao aumento áreas saudáveis e redução significativa da incidência de NIP de alto grau e adenocarcinoma bem diferenciado em camundongos TRAMP (Kido et al., 2020). Os mesmos autores reportaram que a resposta na morfologia prostática identificada após o tratamento com EBM se deu principalmente devido ao atraso do ciclo celular, através do aumento dos níveis de cdk4 e p21, e diminuição da ciclina D1 (Kido et al. 2020). Ainda, o tratamento com PIC, principal polifenol do EBM, diminuiu o processo hiperplásico do epitélio e estroma resultante da hiperplasia prostática benigna (HPB) induzida por testosterona em ratos Wistar por meio de mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios e regulação do eixo Nrf2/HO-1/NF κ B (Eid e Abdel-Naim, 2020). Chung et al., (2015) também reportaram que o resveratrol, análogo do PIC, diminuiu significativamente o peso da próstata e a proliferação celular em ratos com HPB. O diagnóstico de HPB é comumente relacionado ao processo de envelhecimento (Donnell, 2011), mas é importante ressaltar que o modelo utilizado no presente estudo, apesar de idoso não reflete as características desta doença. Embora a literatura tenha demonstrado os benefícios do EBM ou do seu principal composto bioativo em relação aos aspectos estruturais da próstata, não foi possível detectar de forma marcante, apenas pela análise morfológica, características de que o consumo do EBM, rico em

polifenóis, exerceu efeito protetivo na citoarquitetura da próstata de camundongos idosos.

É conhecido que linhagens de roedores utilizadas em laboratório apresentam declínio no ganho de peso durante o envelhecimento, período no qual os organismos se tornam mais susceptíveis a perda de peso devido à redução de massa magra e deficiências metabólicas (Netto & Borgonovi 2002; Duarte et al. 2015). No presente estudo, o tratamento com EBM acentuou a perda de peso nos animais senis, o qual foi associado a redução do consumo de ração. Segundo Vuolo et al., (2020), a ingestão da farinha da casca do maracujá reduziu o ganho de peso corporal em 13,31% e a gordura corporal total em 22,58%, além de reduzir níveis séricos de insulina, da pressão arterial e da frequência cardíaca, melhorando o metabolismo corporal em ratos Sprague-Dawley obesos. Em contrapartida, dados significativos sobre efeitos direto do PIC no consumo alimentar não foram encontrados, mas existem evidências de que o PIC é capaz de influenciar parâmetros relacionados à obesidade como metabolismo de lipídeos (Kershaw & Kim, 2017). A administração de uma única dose de resveratrol (100mg/Kg) em camundongos, por exemplo, foi capaz de suprimir a ingestão de ração por 48h (Kim et al., 2010). A ingestão de polifenóis pode intensificar a perda de peso devido à capacidade destes compostos de aumentar a oxidação de ácidos graxos, além de auxiliar nos processos de lipólise e termogênese (Arraes & Funchal, 2017). De maneira geral, os polifenóis estão associados à perda de peso e controle da inflamação proveniente da obesidade quando consumidos em grandes quantidades na alimentação, sendo na dieta ou na suplementação (Dos Santos Netto et al., 2018; Prazeres, 2018). A a partir dos dados do presente estudo não é possível definir o mecanismo pelo qual o consumo do EBM induziu a redução da ingesta alimentar e de peso corpóreo dos animais, mas este fato merece atenção, uma vez que a perda de peso significativa durante o envelhecimento pode comprometer a efetividade de tratamentos e a condição de saúde de modo geral.

Marcadores do processo angiogênico também foram avaliados no presente estudo como forma de elucidar possíveis mecanismos pelos quais o EBM poderia agir na próstata. Isto posto, visto que o aumento da angiogênese é uma característica

comum na próstata de animais idosos (Huss et al., 2001; Liekens et al., 2001; Macpherson et al., 2003). Uma das razões pelas quais a angiogênese é constantemente ativada durante o processo de envelhecimento é devido ao aumento de lesões proliferativas na próstata, que eventualmente podem implicar em hipóxia das células epiteliais e, conseqüentemente, na necessidade de um aporte sanguíneo maior para suprir a nova demanda energética (Huss et al., 2001; Liekens et al., 2001; Macpherson et al., 2003). Diferentes estudos demonstraram aumento de fatores promotores da angiogênese como VEGF, TGF- β , FGF-2, assim como aumento da microvasculatura prostática durante o envelhecimento, semelhantemente aos resultados observados no presente estudo (Kido et al., 2014; Montico et al., 2015; Lamas et al., 2020). A ativação do processo angiogênico na próstata, nesse período da vida, foi comparável ao processo de neovascularização visto na próstata de camundongos TRAMP, particularmente, nos períodos iniciais do desenvolvimento neoplásico (Montico et al., 2015). A similaridade reportada entre esses dois modelos reforça a ideia de que o envelhecimento leva ao aumento da angiogênese na próstata, evento fundamental no surgimento do câncer de próstata.

Dados da literatura reportaram que o PIC é um agente anti-angiogênico capaz de reduzir a proliferação celular induzida por VEGF, migração e invasão celular, além da formação de tubo das células endoteliais, sem exibir toxicidade (Song et al., 2015; Hu et al., 2020). Acredita-se que o PIC se liga ao VEGF, atenuando o mesmo durante sua ligação ao seu receptor e, por meio desta ligação, suprime a formação de substâncias reativas oxigenadas, e reduz as funções angiogênicas sem apresentar citotoxicidade (Hu et al., 2020). A exposição ao PIC também reduziu a expressão e níveis proteicos de VEGF em células de câncer de próstata humano (DU145), sendo um dos fatores para inibição do potencial migratório deste tipo celular (Kwon et al., 2012). Os mesmos autores apontaram o bloqueio da via IL-6/STAT-3 como mecanismo de ação principal do PIC.

Em relação ao EBM, ou qualquer outro produto do maracujá-azedo provenientes da casca, folhas, sementes ou polpa, não existem dados disponíveis na literatura que abordem o potencial anti-angiogênico. É importante ressaltar que o extrato utilizado no

presente estudo é um produto heterogêneo, o qual apresenta composição não apenas de PIC, mas de outros compostos como, por exemplo, açúcares, ácido cítrico, ácido dicafeolquínico e catequinas (Bassegio et al., 2021). No presente estudo, o EBM reduziu o número de vasos totais marcados pelo antígeno CD31 e, também, a frequência do VEGFR-2, sugerindo possível papel antiangiogênico na próstata dos animais senis. Todavia, é importante salientar que o fato do EBM não ter alterado significativamente os níveis dos marcadores pró-angiogênicos VEGF e TGF- β , sugere que o uso do extrato não atuou de maneira eficaz no processo angiogênico induzido pelo envelhecimento, ou que a quantidade de PIC, contida no extrato, não foi suficiente para bloquear e ou mitigar esse processo. Além disso, o aumento do AR após o tratamento com EBM poderia justificar um possível estímulo extra nos níveis de VEGF, uma vez que é conhecido que andrógenos supraregulam a expressão de VEGF (Eisermann & Fraizer, 2017).

O aumento dos níveis de ER- α concomitante à redução dos níveis de testosterona e AR na próstata de animais idosos estão correlacionados a intensificação do processo inflamatório e surgimento de lesões proliferativas benignas ou malignas, sendo característica comum desta fase da vida (Rochel-Maia, 2010; Cordeiro, 2014; Kido et al., 2014). Ainda, o bloqueio do ER- α durante essa fase de vida previne e ou minimiza o agravamento de lesões na próstata, bem como a progressão do câncer de próstata para fenótipo mais agressivo (Bonkhoff, 2018).

O presente estudo indicou que EBM alterou a sinalização desses receptores de maneira oposta através do aumento dos níveis de AR e diminuição de ER- α . Esses resultados sugerem que a alteração na sinalização hormonal do microambiente prostático de animais idosos pode ser um mecanismo pelo qual o EBM alterou os demais parâmetros relatados no presente estudo, como a angiogênese. Shi & Fu (2019) observaram que o tratamento de PIC em ratos atenuou disfunções testiculares induzidas por cádmio, melhorando aspectos como esteroidogênese e espermatogênese, processos que influenciam a sinalização hormonal de todo organismo. O cádmio induziu a redução significativa dos níveis séricos de testosterona, enquanto que o uso do PIC isolado não alterou este parâmetro, mas quando associado

ao cádmio reestabeleceu os níveis de testosterona, sendo este semelhante ao grupo controle (Shi & Fu 2019). Em contrapartida, estudos utilizando diferentes linhagens de células cancerígenas, incluindo da próstata, são consonantes quanto ao papel antiandrogênico do PIC e resveratrol, os quais mostraram ser capazes de inibir o AR e a atividade da CYP17A1, enzima chave no processo de síntese de hormônios esteroides em diferentes órgãos (Lundqvist et al., 2017; Oskarsson et al., 2014). Já em relação aos efeitos do PIC e resveratrol na via estrogênica, sabe-se que ambos agem como agonistas sobre ERs em células de câncer de mama, dependendo da dose utilizada (Maggiolini et al., 2005; Piotrovskaya et al., 2012). Em conjunto, esses dados demonstraram que o papel do PIC sobre receptores hormonais varia dependendo do modelo estudado, principalmente no câncer, mas polifenóis dietéticos geralmente oferecem pouca ou nenhuma citotoxicidade às células saudáveis (Abbas et al., 2003). Os efeitos do EBM na próstata durante o envelhecimento são inéditos na literatura especializada e trazem novos resultados acerca do potencial de compostos fenólicos na proteção do microambiente prostático.

O presente estudo ainda se propôs a avaliar possíveis alterações no fígado decorrentes do uso do EBM, porém, não foi observado nenhuma diferença morfológica nos padrões nos hepatócitos que pudessem indicar alguma toxicidade. Em animais idosos é comum observar hepatócitos mais claros, muitas vezes vacuolizados, apresentando atipia do núcleo, isto é, alteração morfológicas seja por aumento de volume ou alteração da forma (Gaglianone et al., 1991), assim como observados neste estudo. A fibrose nos vasos sanguíneos é uma outra consequência esperada associada ao envelhecimento (Gaglianone et al., 1991). Desta maneira, pode-se inferir que o envelhecimento prejudicou a estrutura hepática, quadro que não foi revertido após a administração do extrato.

Estudos envolvendo o papel de compostos fenólicos, embora promissores, ainda são prematuros em relação à sua efetividade e efeitos (Pejcic et al., 2019), principalmente quando se trata de extratos heterogêneos como é o caso do EBM. No entanto, a quimioprevenção a partir de fontes alimentícias tem se mostrado como uma alternativa promissora no combate a doenças de longa latência, como é o câncer de

próstata. Acredita-se que polifenóis dietéticos, isolados ou em associação, são uma grande aposta para promover a quimioprevenção de diferentes doenças (Abbas et al., 2013). Dentre os resultados apresentados destacamos o potencial do EBM na regulação da resposta androgênica e estrogênica como um importante achado do presente estudo, uma vez que o desequilíbrio hormonal é elemento chave para o surgimento de desordens prostáticas em indivíduos idosos. Ainda, sugerimos que o uso do EBM combinado com outras drogas já utilizadas no tratamento de afecções prostáticas possa ser benéfico e, possivelmente, potencializar a resposta glandular no combate aos distúrbios do envelhecimento sem maiores prejuízos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A., PATTERSON, W., GERORGEL, P.T. Os potenciais epigenéticos dos polifenóis dietéticos no tratamento do câncer de próstata. **Bioquímica e Biologia Celular**, 91(60): 361-8, 2013.
- ANGELO, P.M., JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, 66(1), 01-09. Recuperado em 12 de outubro de 2020, de http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=pt&tlng=pt, 2007.
- ANTONIOLI, E., DELLA-COLLETA, H.H., CARVALHO, H.F. Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. **Journal of Andrology**. Jan-Feb;25(1):50-6. doi: 10.1002/j.1939-4640.2004.tb02758.x. PMID: 14662786, 2004.
- ARAI, D., KATAOKA, R., OTSUKA, S., KAWAMURA, M., MARUKI-UCHIDA, H., et al. Piceatannol is superior to resveratrol in promoting neuro stem cells differentiation into astrocytes. **Royal Society of Chemistry**, 7, 4432-4441, 2016.
- ARANDA, A., PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiological Reviews**, 81: 1269-1304, 2001.
- ARRAES, G.C.F., FUNCHAL, C. Influência dos polifenóis do chá verde na obesidade. **Nutrição Brasil**, 16(1): 2017.
- AUMÜLLER, G., SEITZ, J. Protein secretion and secretory process in male accessory sex gland. **International Review of Cytology**, 121, 127-231, 1990.
- BADIOLA, I., SANTAOLALLA, F., GARCIA-GALLASTEGUI, P., SÁNCHEZ-DEL REY, A., UNDA, F., et al. Biomolecular bases of the senescence process and cancer: A new approach to oncological treatment linked to ageing. **Ageing Research Reviews** 23, 125-138, 2015.
- 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**, 142, 4066--4075, 2001.
- BANERJEE, P.P., BANERJEE, S., LAI, J.M., STRANDBERG, J.D., ZIRKIN, B.R., et al. Agedependent and lobe-specific spontaneous hyperplasia in Brown Norway rat prostate. **Biology of Reproduction**, 59(5), 1163-1170, 1998.
- BANERJEE, S., BANERJEE, P.P., BROWN, T.R. Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. **Endocrinology**, v. 141, n. 2, p. 821-832, 2000.
- BASEGGIO, A.M., KIDO, L.A., VIGANÓ, J., CARNEIRO, J., LAMAS, C.D.A., MARTÍNEZ, J., SEWAYA, A.C.H.F., CAGNON, V.H.A., MARÓSTICA JÚNIOR, M.R. Systemic antioxidant and anti-inflammatory effects of yellow passion fruit bagasse extract during prostate cancer

proression. **Journal of Food Biochemistry**, 00.e13885. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfbc.13885>, 2021.

BIANCHI-FRIAS, D., VAKAR-LOPEZ, F., COLEMAN, I.M., PLYMATE, S.R., REED, M.J., et al. The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. **PloS One**, 5(9). pii: e12501. doi: 10.1371/journal.pone.0012501, 2010.

BONKHOFF, H. Estrogen receptor signalling in prostate cancer: implications for carcinogenesis and tumor progression. **The Prostate**, 78(1): 2-10, 2018.

BRAT, D.G., AN MEIR, E.G. Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: A new world of angiogenesis research. **The American journal of pathology**. Philadelphia, 158(3):789-96, 2001.

CÂNDIDO, E. M. et al. Terapia hormonal exógena em ratos senis: caracterização dos efeitos sobre os diferentes lobos prostáticos. **Tese de doutorado**, Campinas - SP: [s.n.], 2013.

CAO, Z., KYPRIANOU, N. Mechanisms navigating the TGF- β pathway in prostate cancer. **Asian Journal of Urology**, 2:11-18, 2015.

CARVALHO-SALLES, A.B., TAJARA, E.H. Fatores hormonais e genéticos na próstata normal e neoplasica. **Arquivos Brasileiros de endocrinologia & metabologia**, 43/3: 177-185, 1999.

CHUNG, K., CHEON, S., AN, H. Effects of Resveratrol on Benign Prostatic Hyperplasia by the Regulation of Inflammatory and Apoptotic Proteins. **Journal of Natural Products**, 78(4): 689-94, 2015.

COELHO, E.M., AZEVEDO, L.C., UMSZA-GUEZ, M.A. Fruto do maracujá: importância econômica e industrial, produção, subprodutos e prospecção tecnológica. **Cadernos de Prospecção - Portal de Periódicos da UFBA**, 9(3): 347-61, 2016.

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

CONDON, M.S. The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, p. 132-137, 2005.

CUNHA, G. R., DONJACOUR, A. A., COOKE, P. S., MEE, H., BIGSBY, R. M., et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocrine reviews**, 8(3), 338-362, 1987.

CUNHA, G.R., HAYWARD, S.W., WANG, Y.Z. Role of stroma in carcinogenesis prostate. Differentiation; **research in biological diversity**, 70(9-10): 473-85, 2002.

CUNHA, G.R., ALARID, E.T., TURNER, T., DONJACOUR, A.A., BOUTIN, E.L., FOSTER, B.A. Normal and abnormal development of the male urogenital tract role of androgens, mesenchymalepithelial interactions, and growth factors. **Journal of Andrology**, 13(6), 465-475, 1992.

CUNHA, G.R., RICKIE, W., THOMSON, A., MARKER, P.C., RISBRIDGER, G., HAYWARD, S.W., et al. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, 92, 221-236, 2004.

DE FONSECA, M.A., DE ALMEIDA, R.R., DE ALMEIDA REIS, S.R., DE MEDRADO, A.R.A.P. Repercussão de doenças sistêmicas no reparo tecidual. **Journal of Dentistry & Public Health**, 3(1), 2012.

DEGÁSPARI, C.H., WASZCZYNSKYI, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, 5(1), 2004.

DOLL, J.A., REIHER, F. K., CRAWFORD, S. E., PINS, M. R., CAMPBELL, S. C., et al. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate. **The Prostate**, v. 49, n. 4, p. 293-305, 2001.

DONNEL, R.F. Benign Prostate Hyperplasia: a review of the year's progress from bench to clinic. **Current Opinion in Urology**, 21(1): 22-26, 2011.

DOS SANTOS NETTO, J.V., DA SILVA, D.A.V., SALDANHA FILHO, A., DE AZEVEDO, M.L.G. Polifenóis e sua relação com diminuição de marcadores inflamatórios na obesidade. **Semana de Pesquisa do Centro Universitário de Tiradentes-SEMPESq-Alagoas**, 6, 2018.

DUARTE, M., PAÚL, C. Prevalência de fragilidade fenotípica em pessoas em processo de envelhecimento numa comunidade portuguesa. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, 18(4), 871-880, 2015.

EID, B.G., ABDEL-NAIM, A.B. Piceatannol attenuates testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rats by modulation of Nrf2/HO-1/NF κ B axis. **Frontiers in Pharmacology**, 11: 2219, 2020.

EISERMAN, K., FRAIZER, G. The androgen receptor and VEGF: mechanisms of androgen-regulated angiogenesis in prostate cancer. **Cancers**, 9(4): 32, 2017.

ELLMANN, S., STICHT, H., THIEL, F., BECKMANN, M.W., STRICK, R., STRISSEL, P.L. Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 66(15):2405-26, 2009.

EWERS, I., RIZZO, L.V., FILHO, J.K. Imunologia e Envelhecimento. **Einstein**, 6(supl. 1): 13-20, 2008.

FERRARI, R.A., COLUSSI, F., AYUB, R.A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá-aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 101-102, 2004.

FUJITA, T., MATSUI, T., NAKAO, Y., IMAI, Y. Citocinas e Osteoporose. **Anais da Academia de Ciências de Nova Iorque**, 587: 371-5, 1990.

GEROLA, G.P., VILAS BOAS, N., CAETANO, J., TARLEY, C.R.T., GONÇALVES JR, A.C., et al. Utilization of passion fruit skin by-product as lead (II) ion biosorbent. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, n. 2, p. 1446, 2013.

GÓES, R.M. Interações epitélio estroma na próstata ventral de ratos diabéticos. **Biblioteca Virtual da FAPESP**, doi: <https://bv.fapesp.br/51536>, 2009.

GUNST, S., ZHANG, W. Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. **Cell Physiology**, 295(3), C576-C587, 2008.

GUO, Y., KYPRIANOU, N. Overexpression of transforming growth factor (TGF) beta 1 type II receptor restores TGF-beta1 sensitivity and signaling in human prostate cancer cells. **Cell Growth Differ**, 9:185-93, 1998.

HAYWARD, S.W., ROSEN, M.A., CUNHA, G.G. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. **British Journal of Urology**, 79(2): 18-26, 1997.

HEINLEIN, C.A., CHANG, C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. **Molecular endocrinology**, v. 16, n. 10, p. 2181-2187, 2002.

HELDING, N., PIKE, A., ANDERSON, S., MATTHEWS, J., CHENG, G., HARTMAN, J., et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. **Physiological Reviews**, 87(3):905-31. 14, 2007.

HERPIN, A., LELONG, C., FAVREL, P. Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread super-family of cytokines in metazoans. **Developmental and Comparative Immunology**, 28:461-85, 2004.

HU, W.H., DAI, D.K., ZHENG, B.Y., DUAN, R., DONG, T.X., QIN, Q.W., TSIM, K.K. Piceatannol, um análogo natural do resveratrol, exerce eficácia antiangiogênica por bloqueio da ligação do fator de crescimento endotelial vascular ao seu receptor. **Molecules**, 25 , 3769, 2020.

HUANG, X., LEE, C. Regulation of stromal proliferation, growth arrest, differentiation and apoptosis in benign prostatic hyperplasia by TGF- β . **Frontiers in Bioscience**, 8:740-49, 2003.

HUSS, W.J., HANRAHAN, C.F., BARRIOS, R.J., SIMONS, J.W., GREENBERG, N.M. Angiogenesis and Prostate Cancer: Identification of a Molecular Progression Switch. **Cancer Research**, 61(6), 2001.

IMAMOV, O., SHIM, G.J., WARNER, M., GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor beta in health and disease. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 5, p. 866-871, 2005.

JESIK, C. J., HOLLAND, J. M., LEE, C. An anatomic and histologic study of the rat prostate. **The prostate**, v. 3, n. 1, p. 81-97, 1982.

JONES, E., PU, H., KYPRIANOU, N. Targeting TGF-beta in prostate cancer: therapeutic possibilities during tumor progression. **Expert OpinTher Targets**, 13:227-34, 2009.

KANSO, S. Processo de envelhecimento populacional: um panorama mundial. In: **VI Workshop de análise ergonômica do trabalho, III Encontro Mineiro de Estudos em Ergonomia e VIII Simpósio de Programa de Educação Tutorial em Economia Doméstica, Belo Horizonte**. 2013.

KERSHAW, J., KIM, K. The therapeutic potential of piceatannol, a natural stilbene, in metabolic diseases: a review. **Journal of medicinal food**, v. 20, n. 5, p. 427-438, 2017.

KIDO, L.A., HAHM, E.R., KIM, S.H., et al. Prevention of Prostate Cancer in Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate Mice by Yellow Passion Fruit Extract and Antiproliferative Effects of Its Bioactive Compound Piceatannol. **Journal of Cancer Prevention** 25(2):87-99. doi:10.15430/JCP.2020.25.2.87, 2020.

KIDO, L.A., HETZL, A.C., CÂNDIDO, E.M., MONTICO, F., LORENCINI, R.M., CAGNON, V.H.A. Terapias antiangiogênicas e finasterida: respostas do microambiente da próstata em camundongos idosos. **Life Sciences**, 106(1-2): 58-70, 2014.

KIDO, L. A., MONTICO, F., SAUCE, R., MACEDO, A. B., MINATEL, E., et al. Anti-inflammatory therapies in TRAMP mice: delay in PCa progression. **Endocrine-related cancer**, 23(4), 235-250, 2016.

KIDO, L. A. Inflamação e lesões neoplásicas na próstata: tratamentos quimiopreventivos com Goniotalamina e Celecoxibe em camundongos senis e transgênicos para o adenocarcinoma de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 2017. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/322292>>. Acesso em: 1 set. 2018.

KIDO, L. A., MONTICO, F., VENDRAMINI-COSTA, D. B., PILLI, R. A., CAGNON, V. H. A. Goniothalamine and Celecoxib Effects During Aging: Targeting Pro-Inflammatory Mediators in Chemoprevention of Prostatic Disorders. **The Prostate**, 77(8), 838-848, 2017.

KIM, H. A., VETTERKIND, G., MORGAN, K. Smooth muscle signaling pathways in health and disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 12:2165-80, 2008.

KIM, S.J., LEE, Y.H., HAN, M.D., MAR, W., et al., Resveratrol, purified from the stem of *Vitis coignetiae Pulliat*, inhibits food intake in C57BL/6J Mice. **Archiv de Pharmazie**, 33, 775–780, 2010.

KLOSS, C.C., LEE, J., ZHANG, A., CHEN, F., MELENHORST, J.J., LACEY, S.F., MAUS, M.V., FRAIETTA, J.A., ZHAO, Y., JUNE, C.H. Receptor TGF- β dominante negative aumenta a proliferação de células T CAR humanas direcionadas a PSMA e aumenta a erradicação do câncer de próstata. **Terapia Molecular**, 26(7): 1855-66, 2018.

KRISHNAN, V., HEATH, H., BRYANT, U.H. Mechanism of action of estrogen and selective estrogen receptors modulators. **Vitamins and Hormones**, 60:123-147, 2001.

KUKREJA, A., WADHWA, N., TIWARI, A. Therapeutic Role of Resveratrol and Piceatannol in Disease Prevention. **Journal of Blood Disorders & Transfusion**, 5:240, sep. 2014.

KWON, Gyoo Taik et al. Piceatannol inhibits migration and invasion of prostate cancer cells: possible mediation by decreased interleukin-6 signaling. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 23, n. 3, p. 228-238, 2012.

LAMAS, C.A., KIDO, L.A., MONTICO, F., COLLARES-BUZATO, C.B., MARÓSTICA, M.R., CAGNON, V.H. A jaboticaba extract prevents prostatic damage associated with aging and high-fat diet intake. **Food & function**, 11(2), 1547-1559, 2020.

LAZAR, M.A. Mechanisms of action of hormones that act on nuclear receptors. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, editors. **Williams Textbook of Endocrinology**. Philadelphia:W.B. Saunders Company, p.35-44, 2002.

LEE, W. H., ISAACS, W. B., BOVA, G. S., NELSON, W. G. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, 6(6), 443-450, 1997.

LI, Y., ZHU, H., WEI, X., LI, H. YU, Z., ZHANG, H., LIU, W. LPS induces HUVECAngiogenesis in vitro through miR-146a-mediated TGF- β 1 inhibition. **American Journal of Translational Research**, 9(2): 591-600, 2017.

LIEKENS, S., DE CLERCG, E., NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochemical Pharmacology**, 61 (3): 253-70, 2001.

LIU, S., YANG, F., ZHANG, C., JI, H., HONG, P., et al. Optimization of process parameters for supercritical carbon dioxide extraction of Passiflora seed oil by response surface methodology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 48, n. 1, p. 9-14, 2009.

LIU, T.T., THOMAS, S., MCLEAN, D.T., ROLDAN-ALZATE, A., HERNANDO, D., RICKE, E.A., RICKE, W.A. Prostate enlargement and altered urinary function are part of the aging process. **Aging**, 11(9): 2653-69, 2019.

LOWSLEY, O.S. The development of the human prostate gland with reference to the development of other structures at the neck of the urinary bladder. **American Journal of Anatomy**, v. 13, n. 3, p. 299-349, 1912.

LUNDQVIST, Johan; TRINGALI, Corrado; OSKARSSON, Agneta. Resveratrol, piceatannol and analogs inhibit activation of both wild-type and T877A mutant androgen receptor. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 174, p. 161-168, 2017.

LV, L.F., JIA, H.Y., ZHANG, H.F., HU, Y.X. Nível de expressão e significância clínica de IL-2, IL-6 e TGF- β em pacientes idosos com bócio e hipertireoidismo. **Revisão Européia para Ciências Médicas e Farmacológicas**, 21(20): 4680-86, 2017.

MACPHERSON G.R., NG, S.S.W., FORBES, S.L., MELILLO, G., KARPOVA, T., MCNALLY, J., CONRADS, T.P., VEENSTRA, T.D., MARTINEZ, A., CUTTITTA, F., PRICE, D.K., FIGG, W.D. Anti-angiogenic activity of human endostatin is HIF-1-independent *in vitro* and sensitive to timing of treatment in a human saphenous vein assay. **Molecular Cancer Therapeutics**, 2(9), 2003.

MAGGIOLINI, M., RECCHIA, A.G., BONOFILIO, D., CATALANO, S., VIVACQUA, A., CARPINO, A., RAGO, V., ROSSI, R., ANDO, S. The red wine phenolics piceatannol and myricetin act as agonists for estrogen receptor α in human breast cancer cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, 35(2): 269-81, 2005.

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

MARTÍNEZ, R., TORRES, P., MENESES, M.A., FIGUEROA, J.G., PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A., et al. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1520-1526, 2012.

MASSAGUE, J. TGFbeta signaling in context. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 13:616-30, 2012.

MCNEAL, J.E. The prostate and prostatic urethra: a morphologic synthesis. **The Journal of urology**, v. 107, n. 6, p. 1008-1016, 1972.

MEDEIROS, J.S., DINIZ, M.F.F.M., SRUR, A.U.O.S., PESSOA, M.B. Avaliação das atividade hipoglicemiantes e hipolipemiantes da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*) / Evaluation of the activities hypoglycemic and hipolipidis of the shell of yellow passion fruit (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 41(2):99-101, 2009.

MOHLER, J.L. O câncer de próstata recorrente com castração não é independente de andrógenos. **Avanços na Medicina Experimental e Biologia**, 617: 223-34, 2008.

MONTICO, F. Estroma reativo e próstata = senescência e inibição da angiogênese x lesões glandulares no modelo TRAMP = Reactive stroma and prostate: senescence and angiogenesis inhibition x glandular lesions in the TRAMP model. **Tese de doutorado**, Campinas - SP: [s.n.], 2014.

MONTICO, F., KIDO, L.A., HETZL, A.C., CAGNON, V.H.A. Prostatic angiogenic responses in late life: antiangiogenic therapy influences and relation with the glandular microenvironment in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model. **The Prostate**, 75: 484-499, 2015.

MONTICO, F., KIDO, L.A., HETZL, A.C., LORENCINI, R.M., CÂNDIDO, E.M., CAGNON, V.H.A. Antiangiogenic therapy effects on ageassociated matrix metalloproteinase9 (MMP9) and insulinlike growth factor receptor1 (IGFR1) responses: a comparative study of prostate disorders in aged and TRAMP mice. **Histochemistry and Cell Biology Journal**, 142: 269-284, 2014.

MONTICO, F., KIDO, L.A., MARTIN, R.S., ROWLEY, D.R., CAGNON, V.H.A. Reactive Stroma in the Prostate During Late Life: The Role of Microvasculature and Antiangiogenic Therapy Influences. **The Prostate** 75:1643–1661, 2015.

MOREIRA, M.M. O envelhecimento da população brasileira: intensidade, feminização e dependência. **Revista Brasileira de Estudos de População**, v. 15, n. 1, p. 79-94, 2014.

NIU, Y.N., XIA, S.J. Stroma–epithelium crosstalk in prostate cancer. **Asian journal of andrology**, v. 11, n. 1, p. 28, 2009.

NERDY, N., RITARWAN, K. Hepatoprotective Activity and Nephroprotective Activity of Peel Extract from Three Varieties of the Passion Fruit (*Passiflora Sp.*) in the Albino Rat. Open access **Macedonian journal of medical sciences**, 7(4), 536–542. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.153>, 2019.

NETTO, M., BORGONOV, N. Biologia e teorias do envelhecimento. In **Gerontologia: a velhice e o envelhecimento em visão globalizada** (pp. 44-59), 2002.

OCZKOWSKI, M., DZIENDZIKOWSKA, K., PASTERNAK-WINIARSKA, A., WLODAREK, D., GROMADZKA-ORTROWSKA, J. Dietary Factors and Prostate Cancer Development, Progression, and Reduction. **Nutrients**, 13 (2): 496, 2021.

OLIVEIRA, D.S.M., DZINIC, S., BONFIL, A.I., SALIGANAN, A.D., SHENG, S., et al. The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, 16(1): 8-13, 2016.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). Pela primeira vez, mundo tem ‘mais avós do que netos’, 3 de abril de 2019. Disponível em < <https://www.bbc.com/portuguese/internacional-47799778> >. Acesso em 18 de junho de 2021.

OSKARSSON, T., BATLLE, E., MASSAGUÉ, J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. **Cell stem cell**, 14(3): 306-21, 2014.

OVESNÁ, Z., KOZICS, K., BADER, Y., SAIKO, P., HANDLER, N., et al. Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxy-trans-stilbene in three leukemia cell lines. **Oncology Reports**, 16(3): 617-24, sep. 2016.

PARDALI, E., DIJKEN, P. Transforming growth factor-beta signaling and tumor angiogenesis. **Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)**, 14:4848-61, 2009.

PASCAL, L.E., DHIR, R., BALASUBRAMANI, G.K., CHEN, W., HUDSON, C.N., SRIVASTAVA, P., GREEN, A., DE FRANCO, D.B., YOSHIMURA, N., WANG, Z. Claudin-1 down-regulation in the prostate is associated with aging and increased infiltration of inflammatory cells in BPH. **American Journal of Clinical and Experimental Urology**, 9(1): 53-64, 2021.

PEJCIC, T., TOSTI, T., DZAMIC, Z., GASIC, U., VUKSANOVIC, A., DOLICANIN, Z., TESIC, Z. Os polifenóis como agentes potenciais na prevenção e terapia de doenças da próstata. **Moléculas**, 24(21): 3982, 2019.

PEPPER, M.S. Transforming growth factor beta: vasculogenesis, angiogenesis and vessel wall integrity. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 8(1): 21-43, 1997.

- PERESS, N.S., PERILLO, E. Expressão diferencial dos isotipos TGF-beta 1, 2 e 3 na doença de Alzheimer: um estudo imunohistoquímico comparativo com infarto cerebral, cérebros humanos envelhecidos e de camundongos. **Jornal de Neuropatologia e Neurologia Experimental**, 54(6): 802-11, 1995.
- PIOTROVSKA, H., KUCINSKA, M., MURIAS, M. Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol. **Mutation research**, 750(1):60-82, jan-mar 2012.
- POLVERINI, P.J. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. **Journal of dental education**, 66(8):962-975, 2002.
- PRAZERES, G.A.M. Impacto dos polifenóis na obesidade e afecções relacionadas. **Repositório da Universidade de Lisboa**, trabalho final de mestrado integrado, 2018.
- PRINS, G.S., BIRCH, L., TANG, W.Y., HO, S.M. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. **Reproductive Toxicology**, 23(3), 374-382, 2007.
- REED, M.J., CARRES, M., EYMAN, D., CRUZ, A., BREKKEN, R.A., et al. The effects of aging on tumor growth and angiogenesis are tumor-cell dependent. **International journal of cancer**, v. 120, n. 4, p. 753-760, 2007.
- RITTMASER, R.S., MAGOR, K.E., MANNING, A.P., NORMAN, R.W., LAZIER, C.B. Differential effect of 5- α reductase inhibition and castration on androgen-regulated gene expression in rat prostate. **Molecular Endocrinology** 91:1023–109, 1991.
- RIVARD, A., SILVER, M., CHEN, D., KEARNEY, M., MAGNER, M., ANNEX, B., PETERS, K., ISNER, J.M. Rescue of Diabetes-Related Impairment of Angiogenesis by Intramuscular Gene Therapy with Adeno-VEGF. **The American Journal of Pathology**, 154(2): 355-63, 1999.
- ROCHEL-MAIA, S.S. Modulação androgênica das metaloproteinases de matriz e dos receptores de estrógeno na próstata masculina e feminina de gerbilos. **Tese de Doutorado**, Repositório da Produção Científica e Intelectual da Unicamp, 2010.
- ROSENTHAL, N., BROWN, S. The mouse ascending: perspectives for human-disease models. **Nature Cell Biology**, 9(9): 993-9, 2007.
- ROY-BURMAN, P., WU, H., POWELL, W.C., HAGENKORD, J., COHEN, M.B. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. **Endocrine-related cancer**, 11(2):225-54, 2004.
- RUAN, W., LAI, M. Actin, a reliable marker of internal control?. **Clinica Chimica Acta**, 385(1), 1-5, 2007.
- SCHMIDT, L.J., TINDALL, D.J. Receptor de andrógeno: passado, presente e futuro. **Alvos de Drogas Atuais**, 14(4): 401-7, 2013.
- SENGER, D., DAVIS, G.E. Angiogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 3(8): a005090, 2011.

SHI, J., WANG, L., ZOU, C., XIA, Y., QIN, S., et al. Tumor microenvironment promotes prostate cancer cell dissemination via the Akt/mTOR pathway. **Oncotarget**, v. 9, n. 10, p. 9206, 2018.

SHAPPELL, S.B., THOMAS, G.V., ROBERTS, R.L., HERBERT, R., ITTMANN, M.M., et al. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. **Cancer Research**, v. 64(6): 2270-2305, 2004.

SINN, M., DENKERT, C., STRIEFER, J., PELZER, U., STIELER, J., BAHRA, M., et al. α Smooth muscle actin expression and desmoplastic stromal reaction in pancreatic cancer: Results from the CONKO-001 study. **British journal of cancer**, 111(10), 1917-1923, 2014.

SONG, H., JUNG, J.I., CHO, H.J., HER, S., KWON, S.H., et al. Inhibition of tumor progression by oral piceatannol in mouse 4T1 mammary cancer is associated with decreased angiogenesis and macrophage infiltration. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 26, n. 11, p. 1368-1378, 2015.

SPRENGER, C. C., PLYMATE, S. R., REED, M. J. Extracellular influences on tumour angiogenesis in the aged host. **British journal of cancer**, v. 98, n. 2, p. 250, 2008.

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.

SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R.L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JERNAL, A., BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **A Cancer Journal for Clinicians**, 0: 1-41, 2021.

TAKEDA, H., MIZUNO, T., LASNITZKI, I. Autoradiographic studies of androgen-binding sites in the rat urogenital sinus and postnatal prostate. **Journal of Endocrinology**, 104(1), 87-92, 1985.

TALCOTT, S.T., PERCIVAL, S.S., PITTET-MOORE, J., CELORIA, C. Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(4):935-41, 2003.

TAYLOR, R.A., RISBRIDGER, G.P. The path toward identifying prostatic stem cells. **Differentiation**, 76 (6), 671–681, 2008.

TIMMS, B.G., MOHS, T.J., DIDIO, L.J. Ductal Budding and branching patterns in the developing prostate. **The Journal of Urology**, 151(5):1427-32, 1994.

TOORIANS, A.W., KELLEHER, S., GOOREN, L.J., JIMENEZ, M., HANDELSMAN, D.J. Estimating the contribution of the prostate to blood dihydrotestosterone. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 11, p. 5207-5211, 2003.

TUXHORN, J. A., AYALA, G. E., ROWLEY, D. R. Reactive stroma in prostate cancer progression. **The Journal of urology**, 166(6), 2472-2483, 2001.

UNTERGASSER, G., RUMPOLD, H., HERMANN, M., DIRNHOFER, S., JILG, G., BERGER, P. Proliferative disorders of the aging human prostate: involvement of protein hormones and their receptors. **Experimental Gerontology**, 34(2): 275-87, 1999.

VAN MOORSELAAR, R.J., VOEST, E.E. Angiogenesis in prostate cancer: its role in disease progression and possible therapeutic approaches. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 197 (1-2): 239-50, 2002.

VIGANÓ, J., AGUIAR, A.C., MORAES, D.R., JARA, J.L.P., EBERLIN, M.N., et al. Sequential high pressure extractions applied to recover piceatannol and scirpusin B from passion fruit bagasse. **Food Research International**, 85: 51, 2016.

VILAMAIOR, P.S., FELISBINO, S.L., TABOGA, S.R., CARVALHO, H.F. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. **Prostate**, 45 (3), 253–258, 2000.

VUOLO, M.M., LIMA, G.C., BATISTA, A.G., CARAZIN, C.B.B., CINTRA, D.E., PRADO, M.A., JÚNIOR, M.R.M. Passion fruit peel intake decreases inflammatory response and reverts lipid peroxidation and adiposity in diet-induced obese rats. **Nutrition research**, 76, 106-117, 2020.

WONDRACEK, D. C. Caracterização e diversidade genética de acessos de maracujá do cerrado com base no perfil de carotenóides; **Dissertação de Mestrado** apresentada a Universidade de Brasília Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2009.

WRIGHT, A.S., DOUGLAS, R.C., THOMAS L.N., LAZIER, C.B., RITTMASER, R.S. Androgen-induced regrowth in the castrated rat ventral prostate: role of 5 α -reductase. **Endocrinology**, v. 140, n. 10, p. 4509-4515, 1999.

ZANETONI, C. Alterações na prostata relacionadas com o envelhecimento do esquilo da Mongolia (*Meriones unguiculatus*) : aspectos estruturais, histoquímicos e ultra-estruturais. **Dissertação de Mestrado**, Repositório da Produção Científica e Intelectual da Unicamp, 2002.

ZERAIK, M.L., PEREIRA, C.A., ZUIN, V.G., YARIWAKE, J.H. Maracujá: um alimento funcional?. *Revista Brasileira de farmacognosia*, 20(3), 459-471, 2010.

ZHONG, H., SEMENZA, G.L., SIMONS, J.W., DEMARZO, A.A. Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is an early event in prostate carcinogenesis. **Cancer Detection and Prevention**, 28(2): 88-93, 2004.

ZHOU, D., CHREST, F.J., ADLER, W., MUNSTER, A., WINCHURCH, R.A. Increased production of TGF-beta and Il-6 by aged spleen cells. **Cartas de Imunologia**, 36(1): 7-11, 1993.

ZHU, B., KYPRIANOU, N. Transforming growth factor beta and prostate cancer. **Cancer Treatment Research**, 126:157-73, 2005.

ANEXOS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Avaliação do potencial quimiopreventivo e antiangiogênico do extrato do bagaço de maracujá na próstata ventral frente às alterações decorrentes do processo de envelhecimento, registrada com o nº 4977-1/2018, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quiteto e Giovana Werneck Bortolanza, 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 25 de setembro de 2018.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/09/2018-01/08/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	25/09/2018-01/08/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / FVB/JUnib
No. de animais:	45
Idade/Peso:	08 semanas / 25g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / C57BL/6J-Tg(TRAMP)8247 NgJ
No. de animais:	15
Idade/Peso:	08 semanas / 25g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Anatomia, Área de Anatomia, DBEF, IB/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, 25 de setembro de 2018.

Prof. Dr. Wagner José Fávoro
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 de pesquisadores responsáveis. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

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 Resposta de marcadores de angiogênese no microambiente prostático em camundongos senis frente à administração do extrato de bagaço do maracujá- azedo (*Passiflora edulis*), não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 3 de novembro de 2021

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): Giovana Werneck Bortolanza
RG n.º 90531964


Assinatura :
Nome do(a) orientador(a): Valéria Helena Alves Cagnon Quitete
RG n.º 16793069



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro n° A475808

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei n° 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: A475808
 Usuário: UNICAMP
 CPF/CNPJ: 46.068.425/0001-33
 Objeto do Acesso: Patrimônio Genético
 Finalidade do Acesso: Pesquisa

Espécie

Passiflora edulis

Título da Atividade: Avaliação do potencial anti-proliferativo e antiangiogênico do extrato do bagaço de maracujá na próstata ventral frente às alterações decorrentes do processo de envelhecimento

Equipe

Valéria H A Cagnon Quitete	UNICAMP
Giovana Werneck Bortolanza	Unicamp

Data do Cadastro: 20/09/2018 14:45:12
 Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 13:43 de 24/09/2021



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**