

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

ELLEN NOGUEIRA LIMA

"RESPOSTA DO MICROAMBIENTE DO ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA EM CAMUNDONGOS TRAMP AO TRATAMENTO COM EXTRATO DA CASCA DA JABUTICABA OU BERBERINA, ASSOCIADO AO EFEITO PRÓ-TUMORIGÊNICO DA DIETA HIPERLIPÍDICA"

"PROSTATE ADENOCARCINOMA MICROENVIRONMENT RESPONSE IN TRAMP MICE TO THE JABUTICABA EXTRACT OR BERBERINE TREATMENTS ASSOCIATED TO THE HYPERLIPIDIC DIET PRO-TUMORIGENIC EFFECT"

CAMPINAS

2020

ELLEN NOGUEIRA LIMA

"RESPOSTA DO MICROAMBIENTE DO ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA EM CAMUNDONGOS TRAMP AO TRATAMENTO COM EXTRATO DA CASCA DA JABUTICABA OU BERBERINA, ASSOCIADO AO EFEITO PRÓ-TUMORIGÊNICO DA DIETA HIPERLIPÍDICA"

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e estrutural na Àrea de Biologia Tecidual.

Orientador: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Co-orientador: Mário Roberto Maróstica Júnior

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ELLEN NOGUEIRA LIMA, ORIENTADA PELA PROFA DRA VALÉRIA HELENA ALVES CAGNON QUITETE E CO-ORIENTADA PELO PROF MARIO ROBERTO MARÓSTICA

CAMPINAS

2020

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

 Lima, Ellen Nogueira, 1992-Resposta do microambiente do adenocarcinoma de próstata em camundongos tramp ao tratamento com extrato da casca da jabuticaba ou berberina, associado ao efeito tumorigênico da dieta hiperlipídica / Ellen Nogueira Lima. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.
 Orientador: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete. Coorientador: Mário Roberto Maróstica Junior. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
 Próstata - Câncer. 2. Jabuticaba. 3. Berberina. 4. Neovascularização. I. Quitete, Valéria Helena Alves, 1967-. II. Maróstica Junior, Mário Roberto, 1980-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Prostate adenocarcinoma microenvironment response in tramp mice to the jabuticaba extract or berberine treatments associated to hyperlipidic diet pro-tumorigenic effect

Palavras-chave em inglês: Prostate - Cancer Jabuticaba Berberine Neovascularization Área de concentração: Biologia Tecidual Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural Banca examinadora: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete [Orientador] Rejane Maira Góes Francisco Eduardo Martinez Renata dos Santos Almeida Débora Barbosa Vendramini Costa Data de defesa: 20-11-2020 Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) - ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0001-7850-4725

- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/4854269453568388

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Profa. Dra. Rejane Maira Góes

Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez

Profa. Dra. Renata dos Santos Almeida

Dra. Débora Barbosa Vendramini Costa

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

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por me capacitar e dar forças para vencer a depressão e caminhar em direção a concretização desse trabalho.

A minha família, **Paula, Marcelo, Alan e Henrique**, por apoiarem e torcerem pelos meus objetivos de vida.

Ao **Marçal**, por me ajudar a atravessar um dos momentos mais difíceis da minha vida, possibilitando minha chegada até aqui.

Ao **Henrique Fonseca**, pela parceria de vida e por sempre demonstrar sua admiração por minhas conquistas profissionais.

Aos meus amigos Lia, Melissa e João, por sempre se fazerem presentes com momentos de encorajamento e ajuda em meio aos revezes da minha vida.

A Professora Doutora **Valéria Helena Alves Cagnon Quitete**, pela oportunidade de realização deste projeto em seu laboratório e por sempre se disponibilizar para idealização e orientação desta pesquisa.

Ao Professor Doutor Mário Maróstica, pela co-orientação e disponibilização de seu laboratório e recursos.

Aos meus colegas de laboratório, **Isabela, Andressa, Celina, Larissa, Fabio, Giovana e Felipe**, pela disponibilidade de ajuda no desempenho teórico e prático deste trabalho. Pelos momentos de amizade e confraternização.

A Professora Doutora Lucia Elvira, por disponibilizar seu tempo e recursos em parceria científica.

A Fernanda Veiga e Gabriela Chiarotto, pela dedicação de tempo de ensino nas fases experimentais.

A Professora Doutora **Elaine Minatel** e seu laboratório de pesquisa, pela disponibilização de equipamentos e recursos.

Aos **técnicos** do Departamento de Anatomia, Histologia e Engenharia de Alimentos pelo auxílio nas rotinas de laboratório.

Ao **CEMIB**, por possibilitar o seguimento da linhagem experimental TRAMP desde sua chegada ao Brasil.

Ao programa de **Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural**, por proporcionar a oportunidade de meu crescimento como cientista e docente.

A FAPESP (processo 2018/04579/7) pelo suporte financeiro e incentivo a pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (**CAPES**) - Código de Financiamento 88882.329642/2019-01.

Eu sou aquela mulher que fez a escalada da montanha da vida,

removendo pedras e plantando flores.

Cora Coralina

RESUMO

O câncer de próstata (PCa) é o tipo de câncer mais diagnosticado em homens. Nesse contexto, estudos apontam os efeitos antiproliferativos da jabuticaba e da berberina sobre diversas linhagens celulares de câncer, incluindo o de próstata. O presente estudo teve como objetivos a avaliação de parâmetros estruturais, antioxidativos, angiogênicos e epigenéticos do microambiente prostático de camundongos transgênicos para adenocarcinoma de próstata (TRAMP) frente ao tratamento com o extrato da casca da jabuticaba ou berberina, submetidos ou não à DH. Além disso, objetivou-se analisar os efeitos prótumorigênicos causados pela ingestão da DH sobre os parâmetros citados acima, nos grupos que não receberam tratamento. Camundongos TRAMP foram tratados ou não com extrato da casca da jabuticaba (ECJ) no período de 8 a 16 semanas de idade ou com a berberina no período de 12 a 16 semanas de idade, sendo ou não submetidos à DH a partir da oitava semana de idade até atingir a idade experimental de 16 semanas. O lobo dorsolateral foi coletado para as análises de morfologia, imunohistoquímica, western blotting, real-time PCR e hibridização in situ. O fígado foi coletado para realização das três primeiras análises citadas. O sangue foi coletado para a análise dos perfis glicêmicos, lipídicos e atividade enzimática antioxidante do plasma. Os resultados monstraram que a DH aumentou a incidência de adenocarcinoma bem-diferenciado, marcadores da angiogênese, estresse oxidativo e o gene DACT1. O ECJ atrasou a progressão do PCa e diminuiu esses parâmetros, particularmente, nos animais que consumiram a DH. Ainda, o consumo da DH aumentou o acúmulo de lipídio, de pIRS1 e TNF-α no fígado. O extrato dimiuiu esses fatores no grupo JH (DH tratado com ECJ). O tratamento com berberina aumentou as áreas de epitélio prostático saudável e diminuiu as neoplasias intraepiteliais prostáticas de alto grau associada a redução de VEGF e TGFβ. Além disso, a berberina aumentou as atividades da GPx e SOD total plasmáticos no grupo dieta normolipídica. Por fim, o ECJ apresentou efeitos protetores sobre o metabolismo lipídico hepático e atuou no atraso de alterações estruturais derivadas do sobrepeso através das vias da angiogênese e estresse oxidativo. Ainda, pela primeira vez demonstramos o padrão da expressão gênica da DACT1 no PCa. O ECJ aumentou este gene abrindo caminho para explorações desta via na progressão do PCa. Em conclusão o ECJ foi mais eficaz no atraso da progressão do PCa associado a distúrbios metabólicos provenientes da DH. A berberina atuou no atraso da progressão do PCa, sobretudo no grupo submetido a dieta normolipídica, pela via angiogênica associada ao TGFβ. Ainda, a berberina atuou na melhora sistêmica do estresse oxidativo pela via das glutationas, e este achado se faz importante para a compreenção de sua atuação metabólica. Portanto, concluímos que a berberina mostrou potêncial para o tratamento do PCa em sua fase inicial de desenvolvimento.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is the most commonly diagnosed type of cancer among men. Studies have indicated the jabuticaba and berberine antiproliferative effects in several cancer cell lines, including PCa. Herein, we evaluated the antioxidant, angiogenic and epigenetic parameters of the prostatic microenvironment in the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) submitted to the jaboticaba peel extract (JPE) or berberine treatments. In addition, we analyzed the pro-tumorigenic effects caused by the HD in the groups, which did not received any treatment. TRAMP mice were treated or not with JPE from 8 to 16 weeks of age or berberine from 12 to 16 weeks of age, with HD or normolipid diet from the 8 weeks of age to the experimental age of 16 weeks of age. The dorsolateral lobe was collected for the morphology, immunohistochemistry, western blotting, real-time PCR and in situ hybridization analysis. The liver was collected to perform the first three analyzes mentioned. Blood was collected for glycemic, lipid and antioxidative plasmatic profiles. The results showed that HD increased well-differentiated adenocarcinoma, angiogenesis and oxidative stress markers, besides DACT1 gene. ECJ delayed the PCa progression and decreased these parameters, especially, in the animals that consumed HD. Furthermore, HD consumption increased the lipid, pIRS1 and TNF-a 1 accumulation in the liver. The ECJ reduced these factors in the JH group (DH treated with JPE). Berberine treatment increased the healthy prostate epithelium areas and decreased the high-grade prostatic intraepithelial neoplasia in addition to VEGF and TGFβ reduction. Also, berberine increased GPx and total SOD total plasmatic activities in normolipidic diet group. Finally, JPE showed protective effects on hepatic lipid metabolism and delayed changes derived from overweight by means of angiogenesis and oxidative stress pathways. Also, for the first time, we demonstrated the pattern of PCa DACT1 gene expression. JPE increased this same gene, indicating a new opportunity of investigation of this pathway in the PCa progression. In conclusion, JPE was more effective in delaying the PCa progression when associated with metabolic disorders due to HD intake. Berberine, in turn, delayed the progression of PCa, especially in the normolipidic diet group, by means of the angiogenic and TGF^β pathways. Moreover, the berberine showed an oxidative stress systemic improvement by means of glutathione pathway, and this finding is important to the metabolic performance understanding. Therefore, we conclude that a berberine shown an interesting potential for the PCa treatment in its early states of development.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABD: adenocarcinoma bem-diferenciado AR: receptor de andrógenos CEMIB: centro multidisciplinar para investigação biológica na área da ciência em animais de laboratório CEUA: comissão de ética no uso de animais COX-2: ciclo-oxigenase-2 DAB: 3'3 diaminobenzidina Dact: dishevelled binding antagonist of beta catenin DH: dieta hiperlipídica ECJ: extrato da casca da jabuticaba EF: elementos fibrilares EMT: transição epitélio-mesenquimal ER: receptores de estrógenos EROS: espécies reativas de oxigênio FGF: fator de crescimento dos fibroblastos FML: fibras musculares lisas GPx: glutationa peroxidase GR: Glutationa redutase GSH: glutationa reduzida GTT: teste de tolerância a glicose HIF1: fator responsivo a condições de hipóxia 1 4HNE: 4-hydroxynonenal IGF: fator de crescimento semelhante à insulina IL: interleucina IR: resistência à insulina ITT: teste de tolerância a insulina LA: lobo anterior LDL: lobo dorsolateral LV: lobo ventral MDA: malondialdeído MEC: matriz extracelular MIC1: citocina inibidora de macrófagos 1 MMP: metaloproteinase NIP: neoplasia intraepitelial prostática NF-kB: nuclear fator kappa B PCa: câncer de próstata PCNa: determinação da proliferação celular PPARy: peroxisome proliferator-activated receptor gamma PSA: prostate specific antigen - antígeno específico da próstata SDS: Dodecil sulfato de sódio

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBS-T: Tris-buffered saline with tweeen

SOD: superóxido desmutase

STAT3: ativador de transcrição 3

TIMP: inibidor de metaloproteinase tecidual

TGFβ: fator de crescimento de transformação beta

TNFα: fator de necrose tumoral alfa

TRAMP: camundongos transgênicos para adenocarcinoma de próstata

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Morfofisiologia da próstata	14
1.2 Câncer de Próstata – Incidência, Mortalidade e Tratamentos Atuais	16
1.3 Câncer de Próstata – Histologia e Mecanismos Moleculares	17
1.3.1 Matriz Extracelular	18
1.3.2 Angiogênese	20
1.3.3. Estresse oxidativo	21
1.3.4 Peroxidação Lipídica	21
1.3.5 Epigenética – Via Wnt – 6 catenina e Dact1	22
1.3.6 Antioxidantes e o Câncer de Próstata	23
1.3.7 Câncer de Próstata e Dieta Hiperlipídica	24
1.4 Extrato da Casca da Jabuticaba	26
1.5 Berberina	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	30
3 PARTE I: ARTIGO CIENTÍFICO	
4 PARTE II: MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Animais e Procedimento Experimental	52
4.2 Preparação das Dietas Normolipídica e Hiperlipídica	56
4.3 Extrato da casca da jabuticaba (Myrciaria Jaboticaba Vell Berg)	57
4.3.1 Avaliação dos compostos do extrato da casca da jabuticaba	57
4.3.2 Determinação da dose do extrato da casca da jabuticaba	58
4.3.3 Preparação e tratamento com extrato da casca da jabuticaba	58
4.4 Tratamento com a Berberina	58
4.5 Microscopia de Luz	59
4.6 Determinação de Proliferação Celular	59

SUMÁRIO

4.7 Imunohistoquímica	59
4.8 Análise da densidade de microvasos	60
4.9 Western Blotting	61
4.10 Atividade da Glutationa Redutase (GR)	61
4.11 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobasbitúrico (TBARS)	61
4.12 Atividade da Superóxido Desmutase Total (SOD)	62
4.13 Atividade da Catalase	62
4.14 Atividade da Glutationa Peroxidase Total (GPx)	62
4.15 Extração de RNA	63
4.16 Síntese de DNA Complementar (cDNA)	63
4.17 Desenho de Primers para <i>DACT1</i>	63
4.18 Real-Time PCR	64
4.19 Hibridização <i>in situ</i>	64
4.20 Análise Estatística	65
5 RESULTADOS	65
5.1 Resultados Referentes ao Tratamento com ECJ	65
5.1.1 Análise Morfológica	66
5.1.2 Análise de Proliferação Celular	68
5.1.3 Análise do Estresse Oxidativo	69
5.1.4 Peroxidação Lipídica e Atividade Enzimática do Estresse Oxidativo	71
5.1.5 Avaliação da Matriz Extracelular	73
en ne en e	
5.1.6 Avaliação da Angiogênese	76
5.1.6 Avaliação da Angiogênese 5.1.7 Avaliação da DACT1	76
5.1.6 Avaliação da Angiogênese 5.1.7 Avaliação da DACT1 5.2 Resultados Referentes ao Tratamento com Berberina	76 79 82
5.1.6 Avaliação da Angiogênese 5.1.7 Avaliação da DACT1 5.2 Resultados Referentes ao Tratamento com Berberina 5.2.1 Peso Corporal e Consumo Energético	76 79 82 82
 5.1.6 Avaliação da Angiogênese 5.1.7 Avaliação da DACT1 5.2 Resultados Referentes ao Tratamento com Berberina 5.2.1 Peso Corporal e Consumo Energético 5.2.2 Teste de Resistência à Insulina 	76 79 82 82
 5.1.6 Avaliação da Angiogênese 5.1.7 Avaliação da DACT1 5.2 Resultados Referentes ao Tratamento com Berberina 5.2.1 Peso Corporal e Consumo Energético 5.2.2 Teste de Resistência à Insulina 5.2.3 Análise Morfológica 	76 79 82 82 82
 5.1.6 Avaliação da Angiogênese 5.1.7 Avaliação da DACT1 5.2 Resultados Referentes ao Tratamento com Berberina 5.2.1 Peso Corporal e Consumo Energético 5.2.2 Teste de Resistência à Insulina	76 79 82 82

5.2.6 Imunomarcação de TGF 6	
5.2.7 TBARS e Atividade Enzimática do Estresse Oxidativo	
6 DISCUSSÃO	92
6.1 Discussão Referente ao Tratamento com ECJ	
6.2 Discussão Referente ao Tratamento com Berberina	110
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
8 MATERIAIS ANEXOS COMPLEMENTARES	148
9 APÊNCICES E ANEXOS	150
9.1 Documento CEUA	150
9.2 Declaração de direitos autorais	152

1. INTRODUÇÃO

1.1 Morfofisiologia da próstata

A próstata é uma glândula sexual acessória situada inferiormente à bexiga urinária e ao redor da uretra prostática, que apresenta como função a secreção de componentes do fluido seminal, tais como sódio, potássio, zinco, citrato e antígeno específico da próstata (PSA) (Kavanagh, 1985). Tais elementos desempenham importantes papéis para a sobrevivência e ativação dos espermatozoides (Fair *et al.*, 1976).

Quando comparadas, a próstata de humanos e roedores apresentam diferenças anatômicas e similaridades celulares (Figura 1). De forma geral, a próstata é um órgão único em humanos, com três zonas anatômicas distintas: zona central, zona periférica e zona de transição (Mcneal, 1988; Wang, G. *et al.*, 2018). Já a próstata de roedores apresenta estrutura multilobulada, dividida em quatro pares de lobos: anterior ou glândula de coagulação (LA), dorsal (LD), lateral (LL) e ventral (LV) (Sugimura *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 2011). Os lobos dorsais e laterais são frequentemente descritos em conjunto e referidos como lobo dorsolateral (LDL), pois compartilham um sistema de ducto comum (Figura 2) (Marker *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2016).



Figura 1: Comparação anatômica entre as próstatas de humanos (corte sagital, vista medial) e roedores (corte sagital, vista lateral). (Retirado de Wang *et al.*, 2018).



Figura 2: Posição anatômica (A) e características histológicas (B) dos lobos da próstata em roedores (Retirado de Maker *et al.*, 2003).

Do ponto de vista histológico, a próstata é composta por epitélio simples revestido por três tipos celulares, sendo esses: células secretoras, basais e neuroendócrinas (Frick and Aulitzky, 1991; Marker *et al.*, 2003). O epitélio prostático repousa sobre membrana basal, a qual é composta por finos componentes da matriz extracelular (MEC) tais como; colágeno tipo IV, laminina e heparan sulfato (Kleinman e Weeks, 1989). Já, o estroma prostático é menos espesso, quando comparado ao da próstata humana, sendo composto por fibras musculares lisas, fibroblastos, neurônios e células vasculares linfáticas e sanguíneas (Marker *et al.*, 2003). O estroma prostático interage com as células epiteliais regulando seu desenvolvimento e funções e mantendo a homeostase tecidual (Frick e Aulitzky, 1991)

A morfogênese e o desenvolvimento da próstata são regulados por andrógenos e estes atuam através de seus receptores (Hsing, 2001). A próstata é um importante local de produção não testicular de dihidrotestosterona, que é derivada principalmente a partir da testosterona pela ação da enzima 5α -redutase tipo 2 (Tindall e Rittmaster, 2008). Mais de 95% da testosterona é convertida na andrógeno-dihidrotestosterona (DHT), que então se liga ao receptor de andrógeno (AR) ativado (Frick e Aulitzky, 1991). O complexo receptor hormonal sofre transformação e translocação para o núcleo (Frick e Aulitzky, 1991). No núcleo, após a síntese de mRNA, ocorre transporte deste para o compartimento citoplasmático onde é traduzido em proteínas secretórias que são secretadas no lúmen sob comando neurológico (Frick e Aulitzky, 1991).

A DHT também se liga ao AR nuclear de células estromais da próstata e estimula a produção e secreção de fatores de crescimento e sobrevivência (Takeda e Chang, 1991). Essa secreção se difunde pelo estroma até as células epiteliais, estimulando crescimento e diferenciação (Takeda e Chang, 1991; Kurita *et al.*, 2001). Dessa forma, a via de sinalização do AR no estroma prostático pode modular a expressão de fatores de crescimento produzidos pelos fibroblastos, tais como: o fator de crescimento dos

fibroblastos (FGFs), fator de crescimento endotelial (VEGF) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), que atuam no epitélio promovendo proliferação das células epiteliais (Wen *et al.*, 2015). Por outro lado, os andrógenos também atuam nas células musculares lisas do estroma prostático para que estas possam produzam mitógenos envolvidos no suporte à proliferação das células epiteliais (Cunha *et al.*, 1996; Ishii *et al.*, 2018). Assim, esses efeitos parácrinos mediados por andrógenos entre células epiteliais e estromais mantém a homeostase na próstata adulta (Ishii *et al.*, 2018).

Embora a próstata seja primariamente regulada por andrógenos, o seu desenvolvimento é sensível a outros hormônios, como os estrógenos, que podem atuar estimulando o crescimento tanto do estroma como do epitélio prostático (Bianco *et al.*, 2002; Prins e Korach, 2008). Os efeitos estrogênicos podem influenciar tanto as funções normais da próstata quanto às alterações lesivas desse órgão e são resultados da ligação desses hormônios a receptores estrogênicos específicos α e β (ER α , ER β), os quais são predominantemente expressos no estroma e no epitélio, respectivamente (Leav *et al.*, 2001; Carruba, 2013).

1.2 Câncer de próstata- Incidência, Mortalidade e Tratamentos Atuais

O câncer de próstata (PCa) é o segundo câncer mais diagnosticado em homens, sendo que em 2018 foram diagnosticados em torno de 1,3 milhões de novos casos no mundo (Bray *et al.*, 2018). Essa incidência aumenta com o avanço da idade, sendo que 1 a cada 52 homens com idade entre 50-59 anos desenvolve essa doença e esta estimativa se aproxima de 60% de novos casos em homens com mais de 65 anos (Rawla, 2019). No Brasil, o número de novos casos estimados de PCa para 2020 é de 65.840 novos casos (INCA 2020). Além disso, o PCa é o tipo de câncer com maior incidência entre os homens em todas as regiões do país, sem considerar os tumores de pele não melanoma, com estimativa de mortes em torno de 15.391 em 2017 (INCA 2020).

Os fatores de risco já estabelecidos para o desenvolvimento do PCa são o avanço da idade, fatores genéticos e histórico familiar (Rawla, 2019). Entre outros possíveis fatores está o consumo de dieta rica em gordura, obesidade, hiperglicemia, infecções, exposição a agentes químicos e radiação (Bostwick *et al.*, 2004; Rawla, 2019).

Atualmente, a terapia empregada em pacientes com PCa não metastático, incluem estabilizadores da organização de microtúbulos que inibem a divisão mitótica (Docetaxel e Cabazitaxel), inibidor da síntese de andrógeno (Acetato de Abiraterona), inibidores de andrógenos (Enzalutamida e Darolutamida), radioterapia e prostatectomia (Cattrini *et al.*, 2019). O mecanismo de ação da droga, a via de administração, a duração do tratamento, o impacto na qualidade de vida e o perfil de toxicidade são

fatores importantes a serem considerados ao selecionar uma terapia para um paciente, em particular, pois diferem entre as várias estratégias (Cattrini *et al.*, 2019).

1.3 Câncer de Próstata- Histologia e Mecanismos Moleculares

O PCa é considerado uma doença epitelial e frequentemente estende-se além dos limites normais do órgão (Mcneal *et al.*, 1986). Portanto, para o diagnóstico histológico do PCa deve haver descontinuidade da membrana basal e invasão estromal (Lee *et al.*, 2011). O equilíbrio hormonal entre a relação de andrógenos e estrógenos desempenha papel crucial no desenvolvimento de lesões prostáticas, particularmente durante a idade avançada (Vermeulen *et al.*, 1972; Ellem and Risbridger, 2010). Ainda, a senescência é conhecida por apresentar desorganização estrutural e desequilíbrio hormonal na próstata, associado a lesões glandulares malignas que são observadas de forma semelhante ao observado no modelo camundongo transgênico para adenocarcinoma de próstata (TRAMP) (Vermeulen *et al.*, 1972; Ellem e Risbridger, 2010; Montico *et al.*, 2011; Montico *et al.*, 2015).

A progressão tumoral está relacionada à proliferação epitelial, morfologia tecidual neoplásica e habilidade invasiva (Olumi et al., 1999). Embora o epitélio seja considerado o local inicial do desenvolvimento do PCa, sabe-se que o estroma desenvolve importante resposta para sustentação desse processo, modulando a progressão e agressividade do câncer, bem como o processo de angiogênese e de inflamação (Tuxhorn et al., 2002; Tuxhorn et al., 2002; Barron e Rowley., 2012). Dessa forma, o microambiente estromal no PCa é alterado em comparação com estroma normal e exibe características de estroma de reparo de feridas (Tuxhorn et al., 2002). Esse estroma, pode ser chamado estroma reativo, é composto por miofibroblastos e fibroblastos estimulados a expressar componentes da MEC e desenvolve juntamente com as neoplasias intraepiteliais prostáticas (Tuxhorn, Ayala, et al., 2002). Além dos fibroblastos associados ao tumor, o estroma reativo apresenta células estromais com marcação dupla, sendo uma para identificar vasos e a vimentina (presente em fibroblastos) e outra para a identificação de vasos juntamente com a de fibras musculares lisas, e essas células se desenvolvem associadas ao desenvolvimento das lesões glandulares malignas da próstata (Montico et al., 2015). Nesse contexto, diversos modelos experimentais têm sido desenvolvidos para estudar os aspectos biológicos e genéticos do desenvolvimento do PCa (Wang et al., 2018). O camundongo TRAMP é um desses modelos animais que são frequentemente utilizados no estudo da progressão do PCa (Gingrich et al., 1996; Kido et al., 2019). Nesse modelo, o antígeno SV40 é expresso em células epiteliais secretoras da próstata, sob controle do gene promotor andrógeno-sensível da probasina de rato (Greenberg et al., 1995; Berman-Booty et al., 2012).

Nos animais TRAMP, as lesões desenvolvem-se de forma progressiva, multifocal e heterogênea, assemelhando-se ao PCa clínico com relação à progressão e bioquímica (Kaplan-Lefko *et al.*, 2003). Ainda, no camundongo TRAMP ocorre independência de andrógeno de 80% desses animais ao atingirem 24 semanas de idade, quando castrados com 12 semanas de idade (Kaplan-Lefko *et al.*, 2003; Slack-Davis *et al.*, 2009). Desse modo, o LDL do camundongo TRAMP com 16 semanas de idade, apresenta lesão denominada de neoplasia intraepitelial prostática (NIP) de baixo grau como tipo mais frequente e diminuição das áreas de epitélio saudável em relação a 8 semanas de idade, acompanhado de diminuição de laminina e aumento de células musculares lisas (Berman-Booty *et al.*, 2012; Nogueira Pangrazi *et al.*, 2018). Com relação ao LV, a lesão mais frequente no TRAMP com 18 semanas de idade também é a NIP de baixo grau, seguida da NIP de alto grau e acompanhada de pontuais marcações de linfócitos e microvasos sanguíneos (Gingrich *et al.*, 1999; Mateus *et al.*, 2019) Também, este modelo apresenta o desenvolvimento de processos chaves como a angiogênese, inflamação e remodelação estromal, que estão alterados no PCa, e se assemelham com a doença em seres humanos (Greenberg *et al.*, 1995; Kido *et al.*, 2019).

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, avaliando a progressão do PCa no camundongo TRAMP com a idade de 8 a 12 semanas, demonstraram que o LV apresentou NIP de baixo e alto grau como lesões predominantes nessas idades, sendo que a NIP de alto grau foi mais frequente nos camundongos com 12 semanas do que com 8 semanas (Kido *et al.*, 2016; Da Silva *et al.*, 2017). Com relação ao lobo anterior, este mostrou aumento de NIP de alto grau e ABD na idade de 12 semanas e 22 semanas em relação a 8 semanas de idade (Silva *et al.*, 2018).

1.3.1 Matriz extracelular

Todos os órgãos contêm estruturas celulares e não celulares que forma uma estrutura bem organizada chamada de MEC (Theocharis *et al.*, 2016). Além de oferecer suporte estrutural, esse compartimento regula diversos processos celulares como crescimento, migração e diferenciação (Theocharis *et al.*, 2016). A remodelação da MEC é um processo natural e dinâmico conduzido pelo meio celular local (Karamanos *et al.*, 2019). No entanto, a degradação da MEC é necessária para as habilidades de invasão e metástase das células tumorais (Bonkhoff, 1998; Pego *et al.*, 2018).

Um dos componentes da MEC que sofre remodelação tecidual em condições normais e no microambiente tumoral são as lamininas (Sinha *et al.*, 1989). As lamininas são uma família de glicoproteínas importantes para a estrutura das membranas basais, estando envolvidas em vários processos biológicos, incluindo interações celulares e ligação com outras proteínas da MEC (Rousselle e Scoazec, 2019). Estudos demonstraram que a laminina α1 diminui conforme a progressão do PCa no

LDL do modelo TRAMP (Nogueira Pangrazi *et al.*, 2018). Ainda, a ligação entre a laminina e αdistroglicana é necessária para a ação anti-migratória de linhagens de células de PCa e câncer de mama (Bao *et al.*, 2009).

Também, as metaloproteinases (MMPs) desempenham importante papel tanto em processos normais como malignos no tecido prostático (Alaseem *et al.*, 2019). As MMPs são uma família de 24 enzimas que apresentam habilidade de degradação da MEC dependendo de Zn^{2+} para sua atividade proteolítica (Alaseem *et al.*, 2019). Durante a progressão tumoral, as MMPs como MMP2 e MMP9, atuam na degradação da MEC e, portanto, suas atividades enzimáticas estão aumentadas no plasma e na próstata de pacientes com PCa, sobretudo em processos metastáticos (Morgia *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2008). Assim, a MMP9 está relacionada à invasão tumoral prostática, sendo estimulada pelo AR e está intimamente ligada com a gênese e desenvolvimento da metástase do PCa nos ossos (Mandel *et al.*, 2018; Pego *et al.*, 2018). Por isso, as concentrações plasmáticas de MMP2, MMP9 e MMP13, bem como de suas atividades enzimáticas estão maiores em pacientes com PCa, resistente à castração (Morgia *et al.*, 2005; Skerenova *et al.*, 2017). Além disso, a MMP9 também é fator chave em tumores de PCa primários, onde sua imunomarcação está aumentada e correlacionada ao aparecimento da malignidade do tumor (Baspinar *et al.*, 2017).

A atividade das MMPs é regulada pelos inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPs), que se ligam e inibem a atividade proteolítica das MMPs (Wu *et al.*, 2008). Assim, a expressão do inibidor de metaloproteinase tecidual 1 (TIMP1) tem sido relacionada à progressão do câncer e seu nível sérico parece estar associado com a diminuição da sobrevivência no câncer de próstata resistente à castração (Wu *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2011).

A literatura especializada também demonstrou que as MMPs, especialmente a MMP9, podem ativar o fator de crescimento de transformação beta (TGF β), (Papageorgis, 2015). O TGF β é um peptídeo multifuncional pertencente a uma superfamília citocinas que regulam a proliferação e diferenciação celular, apoptose e migração celular em vários tipos de células (Cao e Kyprianou, 2015). A sinalização do TGF β é mediada pelas vias dependentes e não dependentes de SMAD 2, 3, 6 e 7, pelas quais esse fator está envolvido com o controle da remodelação tecidual tanto em situações fisiológicas normais como patológicas (Cao e Kyprianou, 2015).

Na próstata, o TGFβ parece desempenhar uma dupla função no PCa, atuando como inibidor de proliferação em estágios iniciais e como promotor do desenvolvimento e metástase em estágios avançados da doença (Cao e Kyprianou, 2015). Além disso, estudos demonstraram que a sinalização de

TGF β modulou a progressão do PCa durante metástase, apoptose, angiogênese e transição epitéliomesenquimal (EMT) (Cao and Kyprianou, 2015). Ainda, o TGF β 1 induz fibroblastos da próstata humana a mudarem para o fenótipo de miofibroblasto *in vitro* o que sugere que este fator pode ser um regulador do estroma reativo do câncer de próstata in vivo (Tuxhorn *et al.*, 2002).

1.3.2 Angiogênese

A angiogênese é um importante processo envolvido nas vias de proliferação e metástase, sendo caracterizada pela formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (Russo *et al.*, 2012). Este processo está presente em tecidos saudáveis, mas principalmente, é fundamental para a progressão do câncer no microambiente tumoral (Russo *et al.*, 2012).

Desse modo, a medida que os tumores se expandem, as distâncias de difusão do suprimento vascular existente aumentam, resultando em hipóxia e levando à necessidade de formação de novos vasos sanguíneos para fornecer às células tumorais um suprimento adequado de oxigênio e metabólitos (Liao and Johnson, 2007).

No PCa ocorre aumento da proliferação endotelial (Wong *et al.*, 2014). Assim, estudos demonstraram que o VEGF está aumentado no camundongo senil e no PCa sendo um importante indutor da angiogênese de forma correlacionada com o estágio, grau e densidade de microvasos expressos nessa doença (Montico *et al.*, 2015). Ainda, a próstata tem sido apontada como possível fonte de VEGF e que essa expressão pode contribuir com o crescimento tumoral (Jackson *et al.*, 1997; Strohmeyer *et al.*, 2000; Huss *et al.*, 2001). Além disso, pacientes com PCa metastático apresentam aumento de VEGF no plasma quando comparados aos pacientes com a doença localizada, sugerindo que sua super expressão está relacionada com o crescimento tumoral e metástase (Eisermann e Fraizer, 2017). O VEGF é regulado por múltiplos fatores de transcrição, que respondem a mudanças no microambiente como por exemplo mudanças na sinalização do HIF1α (fator responsivo a condições de hipóxia 1).

Ainda, estudos com o camundongo TRAMP demonstraram que ocorre importante sinalização das vias do VEGF durante a tumorigênese prostática (Huss *et al.*, 2001). Desse modo, inicialmente, ocorre expressão do VEGFR1 juntamente com um microambiente hipóxico durante o desenvolvimento das neoplasias intraepiteliais prostáticas, o qual estimula a expressão de HIF1α pelas células epiteliais (Huss *et al.*, 2001). Posteriormente, ao avanço para o fenótipo maligno, ocorre aumento da expressão de VGFR2 e VEGF nas células tumorais (Huss *et al.*, 2001). Essa mudança de sinalização conhecida como *switch* angiogênico demonstra a importância dessa via durante o desenvolvimento e progressão do PCa

(Huss *et al.*, 2001). Assim, no modelo TRAMP, ocorre aumento da imunoreatividade de VEGF e microvasos conforme a progressão do PCa (Da Silva *et al.*, 2017).

Em adição, além do estudo de fatores como o VEGF em experimentos pré-clínicos e clínicos, frequentemente a atividade angiogênica foi avaliada pela densidade de microvasos (MVD), um marcador bem estabelecido de angiogênese, que se correlacionou bem com o desenvolvimento e metástase do PCa (Sarkar *et al.*, 2020).

1.3.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção e a degradação das EROS, como o peróxido de hidrogênio e radicais livres (Khan *et al.*, 2010). Em decorrência desse processo, o acúmulo de EROS pode interferir nas sinalizações extracelulares, causando danos ao DNA e, por consequência, mutações oncogênicas envolvidas no desenvolvimento de diversos tipos de cânceres, como próstata, pulmão e cólon (Miar *et al.*, 2015; Baig *et al.*, 2019). Assim, em resposta a esse desequilíbrio oxidativo, as células aumentam a produção de antioxidantes como a catalase, SOD e GR, na tentativa de conter a toxicidade das ROS (Baig *et al.*, 2019).

Estudos mostraram que a próstata é, particularmente, vulnerável ao estresse oxidativo pelo fato da atividade androgênica alterar o balanço pró-oxidante-antioxidante das células prostáticas (Ripple *et al.*, 1997).

O soro de pacientes com PCa apresentou redução da atividade enzimática dos antioxidantes catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutationa reduzida (GSH) e aumento do malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica (Ahmed *et al.*, 2019). Ainda, estudos reportaram aumento de biomarcadores da peroxidação lipídica em ratos que receberam células de PCa, bem como redução de enzimas antioxidantes como a catalase, SOD e a glutationa peroxidase (GPx) em estágios iniciais da doença (Bobrowska-Korczak *et al.*, 2019).

Com relação a estudos clínicos, pesquisadores relataram que biópsias de próstata com câncer de alto grau não apresentaram diferenças da catalase em relação a biópsias de hiperplasia benigna, enquanto que as de câncer de baixo grau mostraram redução (Arsova-Sarafinovska *et al.*, 2009).

1.3.4 Peroxidação lipídica

Os peróxidos lipídicos são compostos produzidos preferencialmente pela oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (Gaschler e Stockwell, 2017). Embora os peróxidos lipídicos sejam estáveis o suficiente para persistir bicamadas lipídicas, eles ainda são propensos à degradação (Gaschler e Stockwell, 2017).

Entre os aldeídos produzidos por peroxidação lipídica, o malonaldeído (MDA) tem sido amplamente estudado, visto que o MDA é produzido em altos níveis durante a peroxidação lipídica e por isso é comumente usado como indicativo do estresse oxidativo (Barrera *et al.*, 2018). O 4-hidroxi-2-nonenals (4HNE) também é um aldeído resultante da peroxidação lipídica amplamente estudado por modular vários processos de sinalização, principalmente através da formação de adutos covalentes com grupos funcionais nucleofílicos de proteínas, ácidos nucléicos e lipídios de membrana (Zhong and Yin, 2015). Assim, os produtos da peroxidação lipídica podem reagir com o DNA causando danos e instabilidade em sua estrutura (Tudek *et al.*, 2017).

Com relação à próstata, estudos tem demonstrado que a peroxidação lipídica está aumentada no plasma de pacientes com PCa (Ahmed Amar *et al.*, 2019; Aliseydi Bozkurt *et al.*, 2019). A implantação de tumor de PCa em ratos aumentou biomarcadores da peroxidação lipídica na urina e na próstata desses animais, o que ocorreu concomitante a diminuição da atividade de enzimas como a catalase, SOD e glutationa peroxidase (Bobrowska-Korczak *et al.*, 2019). Assim, a peroxidação lipídica tem sido associada aos primeiros estágios do PCa (Bobrowska-Korczak *et al.*, 2019).

1.3.5 Epigenética, via Wnt-β-catenina e DACT1

A via de sinalização da Wnt- β -catenina tem sido frequentemente associada com alterações celulares que levam ao câncer (Wang, B. *et al.*, 2018). Genes da família Wnt apresentam diferentes expressões no câncer e mutações no gene que codifica a proteína multifuncional β -catenina, as quais estão presentes no PCa (Huguet *et al.*, 1994; Voeller *et al.*, 1998; Ochoa-Hernández *et al.*, 2012). Ainda, a superexpressão da β -catenina promove o desenvolvimento de NIP de alto grau na próstata (Schneider and Logan, 2018). Embora o mecanismo exato de ativação de Wnt no PCa seja incerto, sabe-se que a sinalização de Wnt é um caminho alvo em doenças resistentes à castração (Schneider and Logan, 2018).

Isto posto, a família gênica *Dact* (*dishevelled binding antagonist of beta catenin*) tem sido apontada como reguladora negativa da sinalização Wnt- β -catenina, em particular os genes *Dact1* e *Dact3* (Su *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008). Contudo, outro membro dessa família, denominado *Dact2* tem sido descrito como um potente supressor da via de sinalização de TGF β (Su *et al.*, 2007). Além disso, as Dacts-1, 2 e 3 têm sido estudadas em diferentes tipos de câncer por estarem envolvidas com mudanças epigenéticas que influenciam o desenvolvimento tumoral. Esses efeitos podem ser de supressão do crescimento tumoral e ou de ruptura da integridade de polaridade celular (Su *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2013; Schubert *et al.*, 2014).

Por outro lado, o gene *Dact1* também tem sido associado com a regulação da sinalização da adipogêgene via sinalização Wnt-β-catenina. Assim, existe uma relação da expressão desse gene com o quadro nutricional e seus efeitos na expressão gênica de vias de sinalização intracelular autócrino/parácrina da via Wnt-β-catenina (Lagathu *et al.*, 2009).

Ainda, a literatura especializada aponta que o gene *Dact1* pode apresentar expressão na próstata, no entanto, a expressão dos genes *Dacts* ainda não foi explorada na progressão do câncer desse órgão (Altintas *et al.*, 2013).

1.3.6 Câncer de próstata e antioxidantes

A literatura especializada demonstrou que o PCa é uma doença que permite a avaliação de quimiopreventivo de forma promissora (Syed *et al.*, 2008). De acordo com diferentes autores, a dieta com propriedades antioxidantes foi capaz de reduzir a incidência do PCa e aumentar a sobrevida de camundongos fêmeas TRAMP, demonstrando o potencial terapêutico dessa dieta (Venkateswaran *et al.*, 2004).

É conhecido que os polifenóis são antioxidantes que ampliam as funções de vitaminas e enzimas antioxidantes contra o estresse oxidativo, causado pelas EROS em excesso (Ho *et al.*, 1992; Tsao, 2010). No PCa, os polifenóis agem como agentes quimiopreventivos através da redução de EROS, aumento da atividade de enzimas antioxidantes ou indução de citotoxicidade) e modulação do AR (inibição da expressão e função) (Costea *et al.*, 2019). Ainda, o papel dos polifenóis no tratamento e prevenção do PCa, depende de sua biodisponibilidade, a qual decorre da estrutura química e interação com outros nutrientes (Costea *et al.*, 2019)

Desse modo, frutas que contêm polifenóis, como a uva, têm sido estudadas como suplementos alimentares em forma de extrato, onde este já foi descrito como agente anti-inflamatório no intestino de camundongos com deficiência de interleucina 10, atuando na diminuição de TNF α , interferon gama e do fator nuclear kB (NF-kB) (Shima *et al.*, 2016).

A literatura demonstrou que baixas concentrações de polifenóis provenientes do vinho apresentaram efeito de inibição direta da proliferação de linhagens celulares de PCa humano (Kampa *et al.*, 2000). Ainda, outro componente polifenólico do vinho, denominado resveratrol, foi capaz de aliviar o estresse oxidativo de células do baço de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (DH), além de regular a expressão de mediadores inflamatórios (Wang *et al.*, 2013).

Muitos estudos têm se voltado para a ação dos polifenóis provenientes do chá verde no PCa, demonstrando que esses polifenóis podem regular negativamente a expressão do AR, em nível

transcricional, além de apresentarem efeitos de modulação das vias de sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e de inibição de moléculas envolvidas com a metástase e angiogênese (Ren *et al.*, 2000; Adhami *et al.*, 2004). Os efeitos antiproliferativos do chá verde tem sido atribuídos principalmente ao polifenol epigalo-catequina 3- galato (Miyata *et al.*, 2019). Este composto apresentou tal efeito tanto *in vitro* como *in vivo*, além de suprimir a indução da expressão de genes das citocinas IL-6, IL-8, CXCL-1 *in vitro*, atuando como protetor contra processos inflamatórios (Miyata *et al.*, 2019). Ainda, estudos reportaram que a combinação de polifenóis, provenientes do chá verde, aumentou a eficácia de celecoxibe, um inibidor de Ciclo-oxigenase-2 (COX-2) na inibição do crescimento do PCa tanto *in vitro* como *in vivo* (Adhami *et al.*, 2007). Essa inibição se deu pelo aumento da ativação da caspase-6 e caspase-9, culminando com o aumento de apoptose (Adhami *et al.*, 2007).

Outra ação estudada dos polifenóis provenientes do chá verde é o da supressão da atividade das metaloproteinases 2 e 9 e invasão tumoral em células de PCa. Interessante notar que, esse efeito foi relacionado com a reativação da TIMP-3, pela administração desses compostos bioativos, sendo que a TIMP-3 fora silenciada epigeneticamente antes da administração (Deb *et al.*, 2019).

Ainda, polifenóis da romã reduziram o crescimento de células tumorais da próstata, tanto andrógeno dependente como independente (Gui-Zhi Ma *et al.*, 2015). Esses estudos demonstram que a próstata é responsiva a esses compostos naturais e que estes podem ser promissores quimiopreventivos ou potenciais terapêuticos para essa doença (Adhami *et al.*, 2007; Gui-Zhi *et al.*, 2015).

1.3.7 Câncer de próstata e dieta hiperlipídica

A obesidade tem sido relacionada com a agressividade de diversos tipos de câncer, onde o tecido adiposo atua como foco de inflamação crônica e fonte de adipocinas e lipídios, os quais contribuem para propiciar um microambiente favorável a carcinogênese (Lengyel *et al.*, 2018).

Embora o mecanismo pelo qual o tecido adiposo atua na agressividade do PCa necessite de esclarecimentos de sua biologia, estudos tem evidenciado que os adipócitos operam com ativação parácrina sobre importantes vias pró-tumorigênicas como; angiogênese, imunossupressão, anti-apoptótica e mitogêgica (Kolonin and Digiovanni, 2019). Desse modo, as adipocinas sinalizam tanto para as células tumorais de PCa, como para o recrutamento de outras células estromais tais como; os macrógafos, que então alteram a resposta imune, favorecendo o crescimento tumoral (Kolonin e Digiovanni, 2019).

Afim de investigar a relação entre a qualidade da dieta e o PCa, Gregg e colaboradores acompanharam homens com diagnóstivo de PCa na escala 6 ou 7 de Gleason por 36 meses e calcularam o total de energia e nutrientes consumidos por eles (Gregg *et al.*, 2019). Como resultado, observaram que a adesão

mais rigorosa às diretrizes alimentares dos EUA reduziram o risco de progressão tumoral em pacientes com PCa (Gregg *et al.*, 2019). Essas diretrizes, incluem o consumo de frutas completas, grãos e leguminosas, frutos-do-mar, laticíneos, proteínas e ácidos graxos e minimizam o consumo de açúcares, gordura saturada para menos de 10% por dia (Krebs-Smith *et al.*, 2018).

A literatura tem apresentado diferentes estudos em roedores, propiciando uma análise detalhada sobre os mecanismos que relacionam a obesidade com a progressão do PCa. Assim, estudos têm se concentrado na compreensão do papel da DH na progressão dessa doença (Fujita *et al.*, 2019; Narita *et al.*, 2019).

Facina e colaboradores estudaram os efeitos da DH sobre a próstata do gerbilo e reportaram a presença de lesões associadas a processos inflamatórios e danos ao DNA no LV e LDL após tais animais ingerirem essa dieta (Facina *et al.*, 2018).

Estudos com o modelo TRAMP demonstraram que quando esses camundongos são submetidos a DH com 40% de caloria, provenientes de gordura até 24 semanas, estes apresentaram aumento dos focos de adenocarcinoma prostático em relação aos que consumiram dieta controle (Liu *et al.*, 2019). Dessa forma, várias pesquisas têm focado em possíveis mecanismos pelos quais a DH afeta a carcinogênese prostática (Narita *et al.*, 2019).

A literatura especializada demonstrou que o consumo da DH pelo camundongo TRAMP, aumentou citocinas e adipocinas circulantes como IL-6 e o TNFα, levando ao aumento da taxa metastática nesses animais (Hu *et al.*, 2018). Ainda, o mesmo estudo demonstrou que células DU145, uma linhagem de PCa, tratadas com meio HDF-CM (*HFD-sera-conditioned* médium) obtiveram habilidades proliferativas e invasivas (Hu *et al.*, 2018). Considerando a importância da epigenética no PCa, a modulação do consumo de uma determinada dieta pode influenciar o epigenoma alterando a evolução da doença (Labbé *et al.*, 2015).

Ainda, pesquisadores observaram que o consumo da DH pelo modelo TRAMP aumentou o desenvolvimento do PCa em seus estágios iniciais e diminuiu a glutationa peroxidase-3 (GPx3), que está relacionada a redução do equilíbrio oxidativo (Park *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2014). A relação da DH com o estresse oxidativo também esteve presente em estudos que demonstraram redução de catalase, capacidade antioxidante total e glutationa peroxidase (GSH-Px) em camundongos que consumiram essa dieta (Huang *et al.*, 2012). Além disso, a DH foi capaz de promover o aumento da proliferação celular, da proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1), e de citocinas pró inflamatórias como TNF α , IL-1, and IL-6 (Huang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

Ainda, Ribeiro e colaboradores submeteram ratos com 12 semanas de idade ao consumo de DH com 20% de lipídio, durante 15 semanas, e reportaram mudanças ultraestruturais e atrofia do epitélio secretor, além de hiperplasia das células musculares lisas (Ribeiro *et al.*, 2012). Os mesmos autores demonstraram

que o consumo dessa dieta nas mesmas condições por 30 semanas aumentou as enzimas MMP2 e MMP9, o AR e o VEGF, além de reduzir ER α e a catalase, demonstrando que o sobrepeso é capaz de modular diferentes vias moleculares da próstata propiciando modificações pró-carcinogênicas (Silva *et al.*, 2015).

Cho e colaboradores demonstraram que influência da DH sobre o PCa, pode estar relacionada com a ação dos adipócitos os quais podem promover o crescimento e migração de células do PCa, além de estimular a angiogênese (Cho *et al.*, 2015). Também, o aumento dos níveis de diversas citocinas no sangue e tecido adiposo de camundongos TRAMP foi observado, sendo que mudanças nessas citocinas estão associadas a estimulação da progressão tumoral (Cho *et al.*, 2015).

1.4 Extrato da casca da jabuticaba

É conhecido que a jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba Vell Berg*, uma fruta tipicamente brasileira, apresenta potencial nutricional, contendo polifenóis como as antocianinas (Carvalho-Silva, 2011). Essa fruta tem sido estudada por apresentar potencial antioxidativo tanto *in vivo* como *in vitro* e esses efeitos também foram identificados no quadro da obesidade e do sobrepeso (Carvalho-Silva, 2011; Leite *et al.*, 2011; Lenquiste *et al.*, 2015). Além disso, a jabuticaba demonstrou efeitos benéficos no quadro de diabetes e colesterol (Alezandro *et al.*, 2013b; Batista *et al.*, 2014).

Zhan e colaboradores estudaram os efeitos da jaboticabina, um polifenól presente na casca, polpa e semente da jaboticaba, a qual apresentou ação anti-inflamatória e inibiu IL-8 em células pulmonares SAE expostas a fumaça de cigarro, demonstrando ser um potencial terapêutico na doença pulmonar obstrutiva crônica (Zhao *et al.*, 2019).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que o extrato da casca da jabuticaba (ECJ) apresentou maior conteúdo fenólico bem como capacidade antioxidante comparado à casca de jabuticaba liofilizada (Lamas *et al.*, 2018). Nesse estudo, o tratamento com o ECJ melhorou distúrbios hepáticos e metabólicos em camundongos FVB senis e diminuiu a autofagia no tecido adiposo de camundongos, ambos experimentos em camundongos alimentados com a DH (Baseggio *et al.*, 2018; Lamas *et al.*, 2018). Em adição, as doses de 2,9 e 5,8 g/Kg de ECJ foram capazes de aumentar GPX3 e diminuir catalase, SOD2 e peroxidação lipídica no LV de camundongos da linhagem FVB senis (Lamas *et al.*, 2020). Também, as duas doses de ECJ mencionadas atuaram na diminuição de marcadores inflamatórios, tais como COX2, TLR4 e TNF α em camundongos senis que consumiram DH (Lamas *et al.*, 2020). Em outro estudo, o ECJ demonstrou efeitos antiangiogenicos ao reduzir o VEGF e aumentar a endostatina no LV de camundongos senis (Lamas *et al.*, 2020).

Alburquerque e colaboradores demonstraram recentemente amplo espectro de ações do extrato hidroetanólico do epicarpo da jabuticaba, cuja ação preveniu a peroxidação lipídica no cérebro de suínos, apresentando efeitos antimicrobianos contra uma variedade de bactérias e agiu como antiproliferativo em linhagens de câncer de mama, cervical, hepatocelular e de pulmão (Albuquerque *et al.*, 2020).

A literatura ainda aponta efeitos antiproliferativos e antioxidantes da jabuticaba sobre outras linhagens celulares de câncer, sobretudo de próstata e leucemia (Leite-Legatti *et al.*, 2012). Frutas como a jabuticaba são fontes potenciais de vários fenóis antioxidantes provenientes da dieta (Lamas *et al.*, 2018). Assim, acredita-se que desempenhem importante papel na prevenção de doenças de caráter oxidativo e inflamatório, embora poucos estudos tenham associado o consumo da jabuticaba com a proteção contra o câncer (Leite-Legatti *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014).

1.5 Berberina

A berberina é um alcaloide isoquinolina muito utilizado na medicina chinesa há vários séculos, e é encontrada na raiz e casca de vários tipos de plantas como *Hydrastis canadenses*, *Coptis chinensis*, *Berberis aquifolium*, *Berberis vulgaris* (Vuddanda *et al.*, 2010). Esse alcalóide tem sido reportado como um composto de amplo espectro de ações, entre elas, como tratamento de diarreia, dores abdominais, modulação da microbiota intestinal, diabetes e inflamação (Tillhon *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015). Além disso, a berberina tem sido estudada como possível tratamento contra hipertensão, síndrome do ovário policístico e aterosclerose (Imenshahidi e Hosseinzadeh, 2019).

Diversos mecanismos tem sido propostos como possíveis efeitos da berberina no quadro de melhora do diabetes, incluindo aumento da sensibilidade à insulina, modulação da microbiota intestinal (com o aumento de microorganismos benéficos e redução dos nocivos), estimulação da glicólise e inibição da gliconeogênese no fígado (Imenshahidi e Hosseinzadeh, 2019).

Devido a melhora de doenças cardiovasculares após tratamento com a berberina, Guo e colaboradores desenvolveram uma nanopartícula (BBR-CTA-Mic) para a entrega de 50 mg/kg de berberina durante 8 semanas via intragástrica em camundongos submetidos à DH (Guo *et al.*, 2019). Como resultados, os autores verificaram aumento da deposição de berberina no fígado e consequente redução do aparecimento de lesões aórticas provocavas por deposição de gordura, além de diminuição de lipídios e citocinas pró-inflamatórias no fígado (Guo *et al.*, 2019).

Os efeitos da berberina sobre as vias do metabolismo lipídico são alvos de diversos estudos que já reportaram habilidade inibitória da síntese de colesterol e triglicerídios, aumento de HDL e a melhora

da intolerância à glicose após a administração desse composto (Leng *et al.*, 2004; Brusq *et al.*, 2006). Além disso, a administração da berberina em ratos diabéticos que consumiram DH restaurou os níveis altos de glicose plasmática para o nível normal, além de aliviar a progressão da patologia hepática a nível de morfologia, na diminuição de glicogênio e triglicerídeos e diminuição de receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (PPARγ) (Zhou *et al.*, 2008).

Diversos estudos têm descrito efeitos anticancerígenos da berberina como aumento de apoptose, redução de proliferação, invasão e metástase em diferentes tipos de câncer como carcinoma escamoso da língua, coloretal e pâncreas (Ho *et al.*, 2009; Abrams *et al.*, 2019). Esses efeitos tem sido relacionados com a ação da berberina no aumento das caspases 8 e 9, aumento da transcrição da p53, indução da parada da fase G1 do ciclo celular nas células cancerígenas e diminuição de marcadores da angiogênese como VEGF e HIF1α (Wang *et al.*, 2020). Estudos demonstraram que a berberina induziu a apoptose em células tumorais de diferentes maneiras, tais quais; aumento da proteína pró-apoptótica BAD em células de leucemia e diminuição da proteína anti-apoptótica BCL2 (Liu, D. *et al.*, 2019).

Peng e colaboradores demonstraram que a radiação, usada sinergicamente com a berberina em células de câncer de pulmão, aumentou a sensibilidade dessas células à radiação o que foi confirmado no modelo animal pela diminuição do volume do tumor (Peng *et al.*, 2008).

Ainda, Kim e colaboradores mostraram que a berberina reduziu as MMPs 2 e 9 em células TNBC, de câncer de mama, através da sua capacidade de diminuir o TGFβ1, o que demonstra a sua capacidade inibitória da migração de células cancerígenas (Kim *et al.*, 2018).

Interessante ressaltar que em estudo *in vitro*, a berberina diminuiu a viabilidade de células MCF-7 (câncer de mama), mas não alterou a viabilidade das células epiteliais benignas da mama (Patil *et al.*, 2010). Este estudo ainda mostrou que enquanto baixas concentrações inibiram o crescimento das células MCF-7, foram necessárias altas dosagens para a inibição das células benigas, demonstrando que a toxicidade desse biocomposto pode ser alta para células malignas e baixa para as saudáveis (Patil *et al.*, 2010).

Além da atuação antiproliferativa e pró-apoptótica, a berberina tem sido estudada como um composto de ação antiangiogênica, que atua na modulação do fator indutor de hipóxia 1 (HIF1), e no VEGF, além de inibir a proliferação e migração de células endoteliais *in vitro* (Hamsa e Kuttan, 2012). Os pesquisadores também reportaram a ação antitumoral da berberina no modelo xenográfico de células TNBC onde foi capaz de conter o crescimento tumoral bem como reduzir a capacidade metastática desse tumor (Kim *et al.*, 2018). Ainda, a berberina foi capaz de diminuir os níveis proteicos de H1F1α em células de câncer do cólon e de inibir o VEGFR2 em modelo xenográfico de glioblastoma (Jin *et al.*, 2018; Mao *et al.*, 2018). Em adição, a berberina foi capaz de induzir a apoptose de células de câncer

29

endometrial, cervical e do ovário e diminuir a angiogênese induzida pelo tumor cervical através da diminuição da expressão do VEGF (Mortazavi *et al.*, 2020).

Com relação à próstata, os efeitos da berberina já foram demonstrados em tecidos prostáticos de ratos com hiperplasia benigna, onde diminui a expressão gênica de AR e 5 α redutase, levando à diminuição da proliferação celular e preservando a arquitetura glandular (Youn *et al.*, 2018). Efeitos semelhantes foram encontrados em estudos com as células PC3 e RM-1 de PCa, onde foram observados a redução de proliferação celular com a administração da berberina de forma dose e tempo dependente (Lu *et al.*, 2015). Os autores reportaram que o mecanismo de ação antiproliferativa da berberina foi sua atuação na parada do ciclo celular nas fases G0/G1 ou G2/M (Lu *et al.*, 2015). Outras pesquisas, também observaram a redução do AR, do crescimento celular após tratamento com a berberina em estudo *in vivo* com modelo xenográfico de PCa, bem como o aumento de apoptose nas amostras tumorais (Choi, M. S. *et al.*, 2009; Li, X. *et al.*, 2017).

Ainda, Zhang e colaboradores demonstraram que a berberina foi capaz de potencializar efeitos antiangiogênicos e de supressão tumoral da radioterapia em células de PCa de forma dose dependente (Zhang *et al.*, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

O presente estudo teve como principal objetivo analisar os efeitos do ECJ sobre os parâmetros estruturais, metabólicos, oxidativo, angiogênico e epigenético do microambiente prostático de camundongos TRAMP, bem como avaliar a ação da berberina sobre os parâmetros morfológicos, angiogênicos e oxidativo no modelo mencionado. Além disso, objetivou-se caracterizar a resposta desses parâmetros frente ao tratamento com o ECJ ou com a berberina em animais submetidos ou não aos efeitos pró-tumorigênicos causados pela ingestão da dieta hiperlipídica.

2.2 Objetivos específicos:

1) Quantificar o consumo energético, bem como o ganho de peso dos camundongos TRAMP submetidos ou não ao tratamento com ECJ a partir de 8 semanas de idade até 16 semanas de idade e submetidos ou não a DH a partir da oitava semana de idade;

 Avaliar as respostas aos testes de glicemia de jejum: tolerância à insulina (ITT) e teste de tolerância à glicose (GTT) do sangue da cauda de camundongos TRAMP sob administração ou não do ECJ e submetidos ou não a DH;

3) Caracterizar a histopatologia (morfologia) do LDL de camundongos TRAMP tratados ou não com ECJ e submetidos ou não a DH;

4) Imunolocalizar e quantificar o nível proteico de VEGF e determinar a média da densidade de microvasos e ponto de máxima vascularização através da imunolocalização de CD31 no LDL dos camundongos TRAMP com administração ou não de ECJ e submetidos ou não a DH;

5) Imunolocalizar a o TGF β e quantificar seu nível proteico, no LDL dos camundongos TRAMP, com ou sem tratamento com ECJ e submetidos ou não a DH;

6) Verificar o nível proteico de catalase, *4HNE*, GR, SOD2, laminina 10α1 e MMP9 no LDL de camundongos TRAMP tratados ou não com o ECJ e submetidos ou não a DH;

7) Determinar a proliferação celular (PCNA) do LDL da próstata de camundongos TRAMP tratados ou não com ECJ e submetidos ou não a DH;

8) Avaliar a morfologia e quantificar o nível proteico de pIRS-1, PPAR γ e TNF α no fígado de camundongos TRAMP tratados ou não com ECJ e submetidos ou não a DH;

9) Quantificar a atividade enzimática da catalase, SOD total, bem como o processo de peroxidação lipídica por TBARS no plasma dos camundongos TRAMP tratados ou não com ECJ e submetidos ou não a DH;

10) Avaliar a expressão gênica de DACT1 através do qRT-PCR e hidridação *in situ* no LDL de camundongos TRAMP tratados ou não com ECJ e submetidos ou não a DH;

11) Quantificar o consumo energético bem como o ganho de peso dos camundongos TRAMP submetidos ou não ao tratamento com berberina a partir de 12 semanas de idade até 16 semanas de idade e submetidos ou não a DH a partir da oitava semana de idade;

12) Avaliar a resposta ao teste de tolerância à insulina (ITT) do sangue da cauda de camundongos TRAMP sob administração ou não da berberina e submetidos ou não a DH;

13) Caracterizar a morfologia do LDL de camundongos TRAMP tratados ou não com berberina e submetidos ou não a DH;

14) Imunolocalizar o VEGF e determinar a média da densidade de microvasos e ponto de máxima vascularização através da imunolocalização de CD31 no LDL dos camundongos TRAMP com administração ou não da berberina e submetidos ou não a DH;

15) Imunolocalizar a molécula de TGFβ no LDL dos camundongos TRAMP, com ou sem tratamento com berberina e submetidos ou não á DH;

16)Determinar a proliferação celular (PCNA) do LDL da próstata de camundongos TRAMP tratados ou não com berberina e submetidos ou não à DH;

17) Quantificar a atividade enzimática da catalase, SOD total, GPx, bem como o processo de peroxidação lipídica por TBARS no plasma dos camundongos TRAMP tratados ou não com berberina e submetidos ou não a DH.

A presente tese está organizada nas seguintes partes:

1. A primeira refere-se ao artigo publicado no periódico *Nutrition and Cancer:* High-fat diet effects in prostatic adenocarcinoma model and jaboticaba peel extract intake: Protective response in the metabolic disorders and liver histopathology.

2. A segunda refere-se aos demais resultados que irão fazer parte de dois outros artigos científicos. O título de um dos artigos será: "Effects of Brazilian berry on the prostate cancer microenvironment: the greater the cellular disorders, the greater the positive tissue responses" em fase final de redação para submissão no periódico Life Sciences.

3. PARTE I: ARTIGO CIENTIFICO

Referência: NOGUEIRA-LIMA, E. et al. High-fat diet effects on the prostatic adenocarcinoma model and jaboticaba peel extract intake: protective response in metabolic disorders and liver histopathology. *Nutr Cancer*, p. 1-12, Nov 2019. ISSN 1532-7914. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31696743.

High-fat diet effects in prostatic adenocarcinoma model and jaboticaba peel extract intake: Protective response in the metabolic disorders and liver histopathology

Ellen Nogueira Lima (1), Celina de Almeida Lamas (1), Andressa Mara Baseggio (1,2), Mário Roberto Maróstica Junior (2), Valéria Helena Alves Cagnon (1).

- Department of Structural and Functional Biology, University of Campinas, São Paulo, Brazil.
- (2) Department of Food and Nutrition, University of Campinas, São Paulo, Brazil.

Ellen Nogueira Lima (email adress: ellen.nogueira.lima@gmail.com)

Celina de Almeida Lamas (email adress: celina.lamas@gmail.com)

Andressa Mara Bassegio (email adress: andressambaseggio@gmail.com)

Mário Roberto Maróstica Junior (email adress: mmarosti@unicamp.br)

Valéria Helena Alves Cagnon (email adress: quitete@unicamp.br)

Corresponding author: Valéria Helena Alves Quitete. Phone: (+55) (19) 3521-6103. Fax: (+55) (19) 3289-3124.

Key words: TRAMP, anthocyanins, prostate cancer, liver morphology, high-fat diet

Abstract

Prostate cancer (PCa), overweight and obesity are frequent worldwide health problems. Clinical studies have shown that increased high-fat diet consumption is associated to higher incidence of the PCa. Brazilian berries, such as, *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg, present high polyphenol concentration in the peel and exhibit positive effects on metabolic disorders and hepatic lesions. Therefore, the aim of study herein was to investigate the patented jaboticaba peel extract effects (PJE) on different metabolic parameters and liver histopathology in the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model, receiving either normolipid diet or high-fat diet for 8 weeks. The results showed that PJE reduced insulin resistance and glucose tolerance, decreased hepatic lipid accumulation, lipogenesis and inflammatory markers such as PPAR γ and TNF α , repectively. In conclusion, the PJE treatment promoted protective effects in metabolism of insulin and glucose and liver imbalance caused by HFD intake in the PCa model, suggesting that it may be a good protector against metabolic disorders present in overweight associated with prostate cancer.

1. Introduction

Prostate cancer (PCa) and obesity are a significant worldwide health problem and are associated with mortality increase (Smith and Smith, 2016; Torre *et al.*, 2016). In addition, overweight is associated with several diseases such as type 2 diabetes, cardiovascular disease and cancer development (Bovet *et al.*, 2017). Literature has shown that patients under treatment for metastatic PCa are commonly overweight and the adipose tissue inflammation is linked to aggressive PCa in men (Gucalp *et al.*, 2017; Warner Finstad *et al.*, 2018).

The relation between PCa and overweight could be attributed to cancer cell biology effects on lipid and glucose metabolism (Zadra *et al.*, 2013). Other authors verified metabolic alterations such as aberrant lipogenesis and increased glucose synthesis during cancer (Suburu and Chen, 2012). The insulin systemic imbalance pathway can promote oncogenic signal propagation and cellular proliferation, leading to PCa development (Suburu and Chen, 2012). Furthermore, it is known that metabolic alterations induced by high-fat diet (HFD) intake, can lead to hepatosteatosis formation and hence, can affect prostate size and glandular microenvironment Different studies, in obese rats, have pointed out that diets, rich in polyphenols, can prevent metabolism disorders and improve insulin resistance and antioxidant imbalance (Lenquiste *et al.*, 2012; Batista, A. G. *et al.*, 2014). A Brazilian berry, *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg, which presents high polyphenol concentration in its peel and seed has been the focus of these studies (Abe *et al.*, 2012; Leite-Legatti *et al.*, 2012). It is known that the major phenolic compound, present in in *M. jaboticaba* peel, is anthocyanin, such as cyanidin 3-glucoside and delphinidin 3-glucoside, that is part of the flavonoid group and provides the purple color of the fruit (Plaza *et al.*, 2016; Belwal *et al.*, 2017). Studies showed that anthocyanins were able to reduce insulin resistance, TNF- α and lipid accumulation in an *in vitro* adipocyte assay (Luna-Vital *et al.*, 2017).

Research has demonstrated that the 4% freeze-dried jaboticaba peel, added to the diet, increased the GPx and SOD activities in the liver and also increased the antioxidant activity in the plasma, brain and kidney of the rats fed with a HFD (Lenquiste *et al.*, 2012; Batista, Â. G. *et al.*, 2014). Nowadays, Lamas and collaborators (2018) showed that patented jaboticaba peel extract (PJE) administration, decreased the hyperglycemia, insulin resistance and dyslipidemia besides preventing hepatic steatosis in HFD senile FVB mice.

Thus, several studies have focused on the HFD and polyphenol effect on PCa progression, taking into consideration that obesity and weight gain are related to tumor progression (Dickerman *et al.*, 2017; Chhabra *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2018). However, the relation of the glucose and insulin metabolisms at the beginning of PCa, as well as the polyphenol effects on this condition still need to be better explained (Chhabra *et al.*, 2018; Di Sebastiano *et al.*, 2018). In addition, the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model has been used in different PCa research, presenting progressive lesions and invasive adenocarcinoma (Kido, Larissa Akemi *et al.*, 2019). Therefore, the aim of the study herein was to investigate the PJE effects on the metabolic parameters and liver histopathology in the TRAMP model submitted to HFD intake.
2. Materials and methods

2.1 Experimental procedures

Twenty five male TRAMP mice (C57BL/6-Tg (TRAMP) 8247/Ng/J X FVB/Unib/F1/J) were provided by the Multidisciplinary Center for Biological Investigation on Laboratory Animal Science (CEMIB) in the University of Campinas after approval by Ethics Committee on Animal Use (CEUA) - UNICAMP/Protocol: 4323-1. The mice received water and solid ration *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brazil) and were housed at constant temperature (23°C) and standard dark/light cycle (12-12h) up to the beginning of experimental period. At the 8 weeks of age, the animals were weighed and randomly distributed into following experimental groups (n=5): C group fed a normolipid diet and treated with vehicle; JC group fed a normolipid diet and treated with PJE; H group fed HFD and treated with vehicle; JH: group fed HFD and treated with PJE. The PJE treated groups received 5.8g PJE/Kg body weight and tap water (vehicle) five days per week. The treatment was performed during 8 weeks by gavage.

The TRAMP mice present prostatic lesion in a short time (Berman-Booty *et al.*, 2012). From 6-12 weeks of age the prostate exhibit different lesions degrees such as low-grade prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and high-grade PIN (Da Silva *et al.*, 2017; Kido, L. A. *et al.*, 2019) Around 16 weeks of age, we can observe invasive proliferation points called well-differentiated adenocarcinoma (Berman-Booty *et al.*, 2012; Kido *et al.*, 2016; Nogueira Pangrazi *et al.*, 2018). The different prostatic lesions observed in TRAMP mice are displayed in Figure 1.

The normolipid diet was prepared according to American Institute of Nutrition (AIN 93M)(Reeves *et al.*, 1993) with adaptation for protein content (12%) (Goena *et al.*, 1989). For HFD preparation, AIN 93M formulation was modified with 35% fat (Lenquiste *et al.*, 2012). Diets composition are shown in Table 1.

The PJE of the *Myrciaria cauliflora* ((Vell.) Berg) used in the present study was the same which has already been used in another study of our research group. Thus, the detailed characterization of this of this extract, which was patented, including the nature of the bioactive compounds could be found in the published paper (Lamas *et al.*, 2018). Likewise, the PJE phenolic nature, composition and *in vitro* antioxidant activity has already been performed in detail (Lamas *et al.*, 2018).

After experimental weeks, the mice were anesthetized with 2% xylazine hydrochloride (5mg/kg; Konig, São Paulo, Brazil) and 10% ketamine hydrochloride (60mg/kg; Fort Dodge, Iowa, USA) and euthanized by increasing the anesthetic level. Liver samples were collected for morphology evaluation, lipid profile and western blotting analysis. Blood was collected in tubes with EDTA and the plasma obtained was used to lipid profile and glucose levels analysis.



Figure 1: Photomicrographs of the prostate dorsolateral lobe from the TRAMP mice. a) 8 week old mice, showing healthy histoarchitecture; b) 12-week old mice with low-grade PIN (arrow); c) 16-week old mice with high-grade PIN (asterisk); d) 16-week old mice with well-differentiated adenocarcinoma (arrow head). ES: stroma; L: lumen. Hematoxilin and Eosin. **Table 1** – Composition of the AIN 93 M modified diets.

Ingredients (g/kg)	Standard diet	High-fat diet
Casein (83,5% protein)	143.7	143.7
Maize starch	462	152
Maltodextrin	155	155
Sucrose	100	100
Fiber (cellulose)	50	50
Soybean oil	40	40
Lard	-	310
Mineral mixture (AIN93M)	35	35
Vitamin mixture (AIN93VX)	10	10
L-cystine	1,8	1,8
Choline birtartrate	2,5	2,5
Tert-butylhydroquinone	0,008	0,008
Total	1000	1000
Energy density (Kcal/g)	3,8	5,35

Modified from (Goena et al., 1989; Reeves et al., 1993)

2.2 Body weight gain and energy intake

The animals were weighed at the beginning and at the end of the experiment. The body weight gain (WG) was evaluated considering the initial body weight (WI) and the final body weight (WF) as WG = WF-WI. The energy intake was performed according to the method previously described (Lamas *et al.*, 2018).

2.3 Insulin tolerance test (ITT), glucose tolerance test (GTT) and the fasting glucose levels

The ITT and GTT were measured with 4 and 12-h-fasted mice, respectively, (modified from (Carvalho *et al.*, 2012)). Blood glucose levels were obtained by caudal incision and the glucose measurements were performed using glucometer (Breeze_{TM} – Bayer[®]). Before insulin or glucose administration, the blood glucose was measured. Then, mice received intraperitoneal insulin (10 μ /g) or glucose (0.006/g) by gavage and the blood glucose levels were verified at times 10, 15, 30 and 60 min (ITT test) or 10, 30, 60 and 90 min (GTT test) (modified from (Carvalho *et al.*, 2012)). The ITT and GTT results were expressed considering the area under the curve (AUC) in the glucose versus time graph. The fasting glucose levels was performed in 12-h-fasted mice using a kit from Wiener Lab (Glycemic enzimatic AA, Rosario, Argentin) following the manufacturer instructions and the results were expressed as mg/dL.

2.4 Lipid and glucose profile

The liver lipid content was evaluated in 12-h-fasted mice. The content of triglycerides, total cholesterol, HDL-cholesterol were performed using kits from Wiener Lab (Rosario, Argentin), following the manufacturer instructions. The results were expressed as mg/g. Lipids were extracted from liver fragments (100 mg) frozen at -80°C by means of Folch method (Folch *et al.*, 1957). The total lipid content was diluted in isopropanol and was used for triglycerides and cholesterol assays (commercial kits Wiener Lab) (Folch *et al.*, 1957).

2.5 Light Microscopy

Liver samples were collected and fixed in Bouin's solution for 24 h. Then, the tissues were washed in 70 % ethanol until the fix solution was removed, dehydrated in an increasing alcohol series, diaphanized in xylene and embedded in plastic polymers (Paraplast Plus, St. Louis, USA). Samples were cut into 5-µm-thick sections using the Hyrax M60 microtome (Zeiss, Munich, Germany) and were stained with hematoxylin–eosin (Junqueira *et al.*, 1979). After that, 10 random imagens were captured using 40X objective from Nikon Eclipse E-400 photomicroscope (Nikon, Tokyo, Japan). Therefore, using Image Pro Plus program, a grid with 1800 points was placed on the images and the percentage of lipid hepatic content were determined (modified from (Lamas *et al.*, 2018)).

2.6 Western Blotting

Liver samples were stored at -80°C and then were homogenized using a Polytron homogenizer (Kinematica Inc., Lucerne, Switzerland) in RIPA buffer (Millipore, Temecula, CA) containing protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). The homogenates were centrifuged at 14,000 rpm for 20 min at 4 °C and protein content was analyzed using the Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Then, the supernatants were mixed (1:1) with 3X Laemmli buffer and transferred to a dry bath at 100 °C for 5 min. Protein samples (50 µg) were separated by electrophoresis in SDS-PAGE gels. The resulted gel was transferred to Hybond- ECL nitrocellulose membrane (Amersham, Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL) at 120V for 90 min. The membranes were blocked with 3% BSA for 60 min. Then, were incubated at 4 °C overnight with the following primary antibodies in a dilution range of 1:350–1:500 in 1% BSA: monoclonal mouse anti-tumor necrosis factor alpha (TNF- α) ab8348 (Abcam-EUA); polyclonal goat sc-17196 phosphorylated insulin receptor substrate 1 (pIRS-1) and monoclonal mouse anti-peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARy) sc-7273 (Santa Cruz Biotechnology, CA). Subsequently, the membranes were incubated for 2 h with the HRPconjugated secondary antibodies diluted in a 1:2000-1:5000 range. Peroxidase activity was detected using chemiluminescent solution (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) and captured using the Gene Gnome equipment and the Gene Sys image acquisition software (Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK). Mouse monoclonal anti-β-actin, sc- 81178 (Santa Cruz Biotechnology, CA) antibody was used as an endogen control. The intensity of antigen bands was determined using the Image J (Image Analysis and Processing in Java) software for image analyses.

2.7 Statistical Analysis

The morphological, protein level, lipid and glucose profile parameters were analyzed statistically by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple range test. It was considered the 5% significance level. The results were expressed as mean and standard deviation (Jh, 1999).

3. Results

3.1 Body weight gain and energy intake

The H group showed a body weight gain increase (Figure 2 a), due to the high-energy intake observed in this group compared to the C group (Figure 2 b). The PJE treatment reduced body weight gain in the JC and JH groups. However, the energy intake decreased only in the JH group in relation to its control group (H group) (Figures 2 a, b).



Figure 2: Body weight gain (a) and energy intake evaluation (b). C: group fed a normolipid diet; JC: group fed a normolipid diet and treated with PJE; H: group fed a HFD, JH: group fed a HFD and treated with PJE. ANOVA followed by Tukey test: indication of statistical difference as (*): $p \le 0.5$; (**): $p \le 0.01$; (***): $p \le 0.001$.

3.2 Insulin tolerance test and glucose tolerance test

The ITT and GTT showed significant differences among the experimental groups. The H group showed glucose intolerance and insulin resistance increase compared with the C group. The PJE administration reduced the insulin resistance and the glucose intolerance in the JC group in relation to the C group. There was no significant difference regarding the JH group (Figure 3).



Figure 3: Insulin tolerance test (ITT) and glucose tolerance test (GTT). a) Mean area under the curve and standard deviation of the ITT. b) Mean of blood glucose levels at 0 (before insulin administration), 10, 15, 30 and 60 min after insulin application. c) Mean area under the curve and standard deviation of GTT. d) Mean of blood glucose levels at 0 (before glucose administration), 10, 30, 60 and 90 min, after the glucose solution administration. C: group fed a normolipid diet; JC: group fed a normolipid diet and treated with PJE; H: group fed a HFD, JH: group fed a HFD and treated with PJE. ANOVA followed by Tukey test: indication of statistical difference as (*): $p \le 0.5$ (***): $p \le 0.001$.

3.3 Lipid and Glucose Plasma Levels

The HFD intake increased blood glucose levels in the H group in relation to the C group (Figure 4 a). The PJE treatment reduced the glucose concentration in the JH group compared with the H group (Figure 3 a). The total cholesterol, HDL-cholesterol and triglyceride levels showed no significant difference among the experimental groups (Figures 4 b, c, d).



Figure 4: Lipid and glucose plasma concentrations. a) Glucose concentrations. b) HDL-cholesterol concentrations. c) Total cholesterol concentrations. d) Triglyceride concentrations. C: group fed a normolipid diet; JC: group fed a normolipid diet and treated with PJE; H: group fed a HFD, JH: group fed a HFD and treated with PJE. ANOVA followed by Tukey test: indication of statistical difference as (*): $p \le 0.5$; (**): $p \le 0.01$.

3.4 Liver morphological and lipid evaluation

Liver morphology was similar among the experimental groups (Figure 5). The liver showed a typical hepatic histoarchitecture with hexagonal arrangement of the hepatocyte strands radiating from the centrilobular vein (CV) (Figure 5). Increased lipid frequency was observed in the H group compared to the C group (Figures 4 a, b, e). The PJE treatment decreased the hepatic fat frequency in both experimental groups, JC and JH, in relation to their respective controls (Figure 5 c, d and e). There were no frequent inflammatory infiltrates in the experimental groups (Figure 5).

The HFD intake increased the liver cholesterol levels in the H group compared to the C group (Figure 5 f). The PJE led to liver total cholesterol increase in both treated groups (JC and JH) in relation to their respective controls (C and H) (Figure 5 f). There is no significant difference in the HDL-cholesterol and triglyceride levels among the experimental groups (Figure 5 g, h).



Figure 5: Photomicrographs and lipid profile of the liver in the experimental groups after the treatment. a) C: group fed a normolipid diet. b) JC: group fed with a normolipid diet and treated with PJE. c) H: group fed a HFD showing lipid in the cytoplasm (arrow in the inset). d) JH: group fed a HFD and treated with PJE. e) Fat liver quantification. f) Total cholesterol liver concentrations. g) HDLcholesterol liver concentrations. h) Triglyceride liver concentrations. ANOVA followed by Tukey test: indication of statistical difference as (*): $p \le 0.5$; (**): $p \le 0.01$; (***): $p \le 0.001$. CV: centrilobular vein. Hematoxilin and Eosin (a-d).

3.5 Western blotting evaluation

The PPAR-γ protein levels did not change in the H compared to the C group (Figures 6 a, b). However, these protein levels decreased significantly in both PJE treated groups (JC and JH) in relation to their respective control groups (C and H) (Figure 6 a) . The pIRS-1 levels showed no statistical difference in the H group in relation to the C group, in contrast, decreased pIRS-1 was seen after PJE treatment in the JH group compared to the H group (Figure 6 b).

The TNF- α protein level increased in the H group in relation to the C group (Figure 6 c). TNF- α dropped, significantly, only in the JH group (Figure 6 c).



Figure 6: Western blotting analysis. a) PPAR- γ protein level evaluation. b) pIRS-1 protein level evaluation. c) TNF- α protein level evaluation. C: group fed a normolipid diet; JC: group fed a normolipid diet and treated with PJE; H: group fed a HFD, JH: group fed a HFD and treated with PJE. ANOVA followed by Tukey test: indication of statistical difference as (*): p \leq 0.5; (**): p \leq 0.01; (***): p \leq 0.001. The results are shown as mean percentage ± standard deviation in relation to the endogenous control β -actin.

4. Discussion

This study showed that patented jaboticaba peel extract (PJE) improved the metabolic disturbance caused by overweight, decreasing energy intake and leading to hepatoprotection in the PCa model fed with a high-fat diet. These results are in agreement with previous studies which demonstrated obesity prevention after jaboticaba peel extract intake by high-fat-diet-fed aged mice (Lamas *et al.*, 2018).

Our research showed that PJE promoted weight gain prevention, particularly after hyperlipidic diet, considering the reduction of energy intake. These results also were in agreement with previous studies by Lamas eta al., 2018. On the other hand, Bassegio and collaborators verified that jaboticaba peel extract administrated for 6 weeks, from thirteen weeks of age, decreased body weight but not food intake in the C57BL/6 (Baseggio *et al.*, 2018). However, the administration period of the jaboticaba

extract was carried out on older animals than those observed in the present study and the experimental model did not present Pca (Baseggio *et al.*, 2018). Also, different studies showed that the 1%, 2% and 4% of the freeze-dried jaboticaba peel, added to the diet for 10 weeks, was not able to reduce weight gain and or food intake in the high-fat fed rats (Lenquiste *et al.*, 2012; Batista, A. G. *et al.*, 2014; Batista, Â. G. *et al.*, 2014). Thus, our findings suggest that PJE has the potential to be used as a therapeutic agent for prevention and treatment of overweight under PCa conditions.

Jaboticaba peel is pointed out as being an anthocyanin source, such as cyanidin 3-glucoside, and several studies have evaluated the effects of anthocyanin rich fruit ingestion on obesity comorbidities (Lenquiste et al., 2012; Plaza et al., 2016; Van Der Heijden et al., 2016). Evidence indicated that anthocyanins were able to reduce leptin secretion, which is the hormone that is responsible for reducing food intake and acting on insulin resistance and hyperglycemia, suggesting that there is a possible action mechanism to explain the energy intake reduction observed in our study (Prior et al., 2010; Tucakovic et al., 2018). Interestingly, insulin resistance and glucose intolerance improvement after PJE only occurred in mice that consume a normolipid diet. On the other hand, plasma glucose levels decreased in the HFD-fed mice. Lamas and collaborators observed that to PJE treatment improved glucose intolerance and insulin resistance in aged or high-fat-fed aged mice. The metabolic response was more effective when severe damages were seen in the high fat diet group, administering the higher PJE dose. It is important to consider that insulin resistance is related to several important mechanisms involved in cancer progression such as inflammation and cell growth (Godsland, 2009). Also, high-fat fed TRAMP mice exhibited serum insulin growth factor 1 (IGF-1) higher than normolipid diet fed TRAMP mice (Xu et al., 2015). Considering this fact, we suggest that the high-fat-fed PCa model could present severe alterations which the PJE dose was not able to show glucose intolerance and insulin resistance beneficial effects Nevertheless, our results suggested that PJE could interfere in a good way in the insulin metabolism in PCa model.

The results herein did not increase the HDL-cholesterol plasma levels in high-fat-fed transgenic mice after PJE treatment. Nevertheless, previous studies demonstrated an HDL increase in high-fat-fed rodents after freeze-dried jaboticaba peel or jaboticaba peel extract intake (Lenquiste *et al.*, 2012; Lamas *et al.*, 2018). Also, clinical studies reported that anthocyanin intake increased HDL-cholesterol without any effect on total cholesterol in dyslypidemic patients (Qin *et al.*, 2009). In addition, epidemiological analyses revealed that the high circulating cholesterol levels have been associated with PCa risk diagnosis and progression (Suburu and Chen, 2012; Schnoeller *et al.*, 2017). Thus, due to the fact that, high HDL-cholesterol serum levels have been linked to lower risk of PCa in smokers between 50 and 69 years old (Mondul *et al.*, 2011). Thus, we suggest that the the present transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model which presents PCa did not response in the same way in

relation to this parameter. Thus, the PJE was not effective on the HDL-cholesterol serum levels in the used dose in this cancer model.

It is known that the liver plays a central role in lipid metabolism, being responsible for cholesterol accumulation decrease in the tissues and acting in the control of circulating lipoproteins (Ponziani *et al.*, 2015). In the present study, we observed that HFD increased the hepatocellular lipid accumulation and liver cholesterol. PJE treatment decreased the accumulation of lipid. In addition, we verified an insulin receptor substrate 1 (pIRS1) and TNF- α increase after HFD intake and a reduction of these molecules after PJE treatment as well as a peroxisome proliferator-activated (PPAR γ) increase. PPARs are a superfamily of nuclear hormones that can modulate the gene expression involved in lipid and glucose metabolism (Domínguez-Avila *et al.*, 2016). It is know that PPAR α promotes fat utilization and the PPAR γ activation promotes its storage (Berlanga *et al.*, 2014). Under normal conditions, the liver has low PPAR γ concentrations and high hepatic levels of PPARs are related to increased lipogenesis in obese patients with non-alcoholic fatty liver (NAFLD) (Pettinelli and Videla, 2011; Souza-Mello, 2015). The PPAR γ liver levels did not differ between normolipid and high-fat diets. This could be due to the fact that we did not observe a dyslipidemia or NAFLD in TRAMP model after high-fat diet consumption, besides our results showed evidences of increased liver total cholesterol and liver lipid accumulation.

According to our results, the PJE treatment improves the liver fat metabolism by decreasing PPAR γ which is in agreement with Batista and collaborators (Batista *et al.*, 2018). In their research, Swiss mice, fed with HFD, showed small triglyceride droplets and a high expression of the PPAR α mRNA in the liver. These authors also observed that freeze-dried jaboticaba peel treatment decreased these parameters and increased serum HDL-cholesterol (Batista *et al.*, 2018). In addition, anthocyanin-rich purple-corn extract reduced the lipid accumulation, TNF α and PPAR γ protein levels in *in-vitro* adipocytes assay (Luna-Vital *et al.*, 2017). On the other hand, a previous study from our group demonstrated that PPAR γ increased in high-fat-fed aged mice after PJE administration (Lamas *et al.*, 2018).

The insulin receptor 1 (IRS-1) plays a critical role in the activation of the liver insulin signaling together with insulin receptor 2 (IRS-2) (Dong *et al.*, 2006). IRS phosphorylation is necessary for insulin signaling propagation in the cell and its decrease is correlated with insulin resistance (IR). Recently, the literature demonstrated that polyphenols could increase the pIRS-1 protein levels in the liver in high-fat-fed mice (Liu *et al.*, 2017). However, Honma and collaborators studied the IRS-1 and IRS-2 expression in the liver of patients with NAFLD and steatosis (Honma *et al.*, 2018) and demonstrated that there were no changes in IRS-1 mRNA, in contrast to IRS-2, which demonstrated a significantly decrease (Honma *et al.*, 2018). In addition, the literature showed that IRS1 and IRS2 roles

in insulin signaling could be tissue specific (50). According to these authors, mice with mutation in the IRS1 presented a systemic IR, interfering in the insulin signaling in the liver, skeletal muscle and adipose tissue (50). However, in the IRS2 mutation mice, IR occured primarily in the liver through IRS2 signaling, which demonstrated its importance in this pathway (Kido *et al.*, 2000). Thus, taking into consideration the results above-mentioned, we suggest that systemic insulin resistance improvement could not be linked just to decreased pIRS-1 liver levels and decreased lipid accumulation which were observed in this study, but it could be linked to other insulin receptors. However, more studies are required regarding IR signaling in the liver, particularly in mice, which have PCa.

It is well established that anti-inflammatory cytokines produced by adipose tissue in obesity contribute to systemic and hepatic TNF α increase (Berlanga *et al.*, 2014; Lamas *et al.*, 2018). Previous authors observed that high TNF α plasma levels is related to a high degree of liver fibrosis in obese patients with NAFLD (Berlanga *et al.*, 2014). TNF α cytokine has been reported to be an important IR regulator, because of its ability to induce IRS-1 serine phosphorylation and decrease its affinity for insulin receptor (Gual *et al.*, 2005). In addition, a study by our research group showed the PJE anti-inflammatory effect, reducing also liver TNF α , is an important aspect associated to its capacity to prevent hepatic steatosis in high-fat-fed aged mice. In agreement with our results, HFD consumption led to an important inflammatory marker increase in the liver and the PJE administration was able to prevent this HFD deleterious effect, possibly preventing the lipid and insulin metabolism alterations.

5. Conclusion

Considering the relationship between overweight and PCa progression, our results highlighted diet interference in the systemic balance of the organism in the PCa model. Thus, our results emphasized that PJE treatment demonstrated protective effects in weight gain and insulin resistance also in the TRAMP mice model. In conclusion, PJE treatment promoted protective effects in the insulin and glucose metabolism and liver imbalance caused by HFD intake in the PCa model, suggesting that it may be a good alternative against metabolic disorders, considering the association of overweight and prostatic cancer.

6. Funding and Acknowledgment

This work was supported by the CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Level -or Education- Personnel) and FAPESP (São Paulo Research Foundation-2018/04579-7).

Acknowledgment: Technical support/animals- Multidisciplinary Center for Biological Investigation on Laboratory Animal Science (CEMIB)/University of Campinas

7. Conflit of Interest

The authors have declared no conflict of interest.

8. References

Abe, L. T., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2012). Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: jabuticaba (Myrciaria jaboticaba (Vell.) Berg). *Journal of the Science and Food Agriculture*, *92*(8), 1679-1687.

Baseggio, A. M., Nuñez, C. E. C., Dragano, N. R. V., Lamas, C. A., Braga, P. A. d. C., Lenquiste, S. A., et al. (2018). Jaboticaba peel extract decrease autophagy in white adipose tissue and prevents metabolic disorders in mice fed with a high-fat diet. *Pharma Nutrition*, *6*(4), 147-156.

Batista, A. G., Lenquistea, S. A., Cazarina, C. B. B., Silva, J. K. d., Luiz-Ferreira, A., Jr, S. B., et al. (2014). Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. *Journal of functional Foods*, *6*, 4 5 0 –4 6 1.

Batista, Â. G., Leita-Legatti, A. V., Lima, M. C. G. d., Prado, M. A., & Junior, M. R. M. (2014). Effects of Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel on blood glucose and cholesterol levels in healthy rats. *African Journal of Biotechnology*, *13*(*37*), 3805-5315.

Batista, Â. G., Silva-Maia, J. K. d., Monique Culturato P. Mendonça c , Soares, E. S., Lima, G. C., Junior, S. B., et al. (2018). Jaboticaba berry peel intake increases short chain fatty acids production and prevent hepatic steatosis in mice fed high-fat diet. *Journal of Functional Foods*, *48*, 266-274.

Belwal, T., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., & Habtemariam, S. (2017). Dietary Anthocyanins and Insulin Resistance: When Food Becomes a Medicine. *Nutrients*, *9*(10).

Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porras, J. A., & Auguet, T. (2014). Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, *7*, 221-239.

Berman-Booty, L. D., Sargeant, A. M., Rosol, T. J., Rengel, R. C., Clinton, S. K., Chen, C. S., et al. (2012). A review of the existing grading schemes and a proposal for a modified grading scheme for prostatic lesions in TRAMP mice. *Toxicologic Pathology*, *40*(1), 5-17.

Bovet, P., Chiolero, A., & Gedeon, J. (2017). Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries. *New England Journal of Medicine*, *377*(15), 1495-1496.

Carvalho, C. P., Oliveira, R. B., Britan, A., Santos-Silva, J. C., Boschero, A. C., Meda, P., et al. (2012). Impaired βcell-β-cell coupling mediated by Cx36 gap junctions in prediabetic mice. *American Journal Physiology Endocrinology Metabolism*, 303(1), E144-151.

Chhabra, G., Singh, C. K., Ndiaye, M. A., Fedorowicz, S., Molot, A., & Ahmad, N. (2018). Prostate cancer chemoprevention by natural agents: Clinical evidence and potential implications. *Cancer Letters*, *422*, 9-18.

Crespo, J., Cayón, A., Fernández-Gil, P., Hernández-Guerra, M., Mayorga, M., Domínguez-Díez, A., et al. (2001). Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*, *34*(6), 1158-1163.

da Silva, R. F., Nogueira-Pangrazi, E., Kido, L. A., Montico, F., Arana, S., Kumar, D., et al. (2017). Nintedanib antiangiogenic inhibitor effectiveness in delaying adenocarcinoma progression in Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP). *Journal of Biomedical Science*, *24*(1), 31.

Di Sebastiano, K. M., Pinthus, J. H., Duivenvoorden, W. C. M., & Mourtzakis, M. (2018). Glucose impairments and insulin resistance in prostate cancer: the role of obesity, nutrition and exercise. *Obesity Reviews*, *19*(7), 1008-1016.

Dickerman, B. A., Ahearn, T. U., Giovannucci, E., Stampfer, M. J., Nguyen, P. L., Mucci, L. A., et al. (2017). Weight change, obesity and risk of prostate cancer progression among men with clinically localized prostate cancer. *International Journal of Cancer*, *141*(5), 933-944.

Domínguez-Avila, J. A., González-Aguilar, G. A., Alvarez-Parrilla, E., & de la Rosa, L. A. (2016). Modulation of PPAR Expression and Activity in Response to Polyphenolic Compounds in High Fat Diets. *Int J Mol Sci*, *17*(7).

Dong, X., Park, S., Lin, X., Copps, K., Yi, X., & White, M. F. (2006). Irs1 and Irs2 signaling is essential for hepatic glucose homeostasis and systemic growth. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(1), 101-114.

FOLCH, J., LEES, M., & SLOANE STANLEY, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.

Godsland, I. F. (2009). Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer. *Clinical Science (Lond)*, *118*(5), 315-332.

Goena, M., Marzo, F., Fernández-González, A. L., Tosar, A., Frühbeck, G., & Santidrián, S. (1989). Effect of the raw legume Vicia ervilia on muscle and liver protein metabolism in growing rats. *Rev Esp Fisiol*, *45 Suppl*, 55-59.

Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., & Tanti, J. F. (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*, *87*(1), 99-109.

Gucalp, A., Iyengar, N. M., Zhou, X. K., Giri, D. D., Falcone, D. J., Wang, H., et al. (2017). Periprostatic adipose inflammation is associated with high-grade prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Disease*, 20(4), 418-423.

Honma, M., Sawada, S., Ueno, Y., Murakami, K., Yamada, T., Gao, J., et al. (2018). Selective insulin resistance with differential expressions of IRS-1 and IRS-2 in human NAFLD livers. *International Journal of Obesity (Lond)*.

Hu, M. B., Xu, H., Zhu, W. H., Bai, P. D., Hu, J. M., Yang, T., et al. (2018). High-fat diet-induced adipokine and cytokine alterations promote the progression of prostate cancer. *Oncology Leterst*, *15*(2), 1607-1615.

JH, Z. (1999). Biostatistical Analysis. New Jersey, USA.

Junqueira, L. C., Bignolas, G., & Brentani, R. R. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochemistry Journal*, *11*(4), 447-455.

Kido, L. A., de Almeida Lamas, C., Maróstica, M. R., & Cagnon, V. H. A. (2019). Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP) model: A good alternative to study PCa progression and chemoprevention approaches. *Life Science*, *217*, 141-147.

Kido, L. A., Lamas, C. d. A., Maróstica, M. R., & Cagnon, V. H. A. (2019). Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP) model: A good alternative to study PCa progression and chemoprevention approaches. *Life Science*, *217*, 141-147.

Kido, L. A., Montico, F., Sauce, R., Macedo, A. B., Minatel, E., Vendramini Costa, D. B., et al. (2016). Antiinflammatory therapies in TRAMP mice: delay in prostate cancer progression. *Endocrine-Related Cancer*.

Kido, Y., Burks, D. J., Withers, D., Bruning, J. C., Kahn, C. R., White, M. F., et al. (2000). Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *The Journal Clinical Investigation*, *105*(2), 199-205.

Lamas, C. A., Lenquiste, S. A., Baseggio, A. M., Leite, L. C., Kido, L. A., Aguiar, A. C., et al. (2018). Jaboticaba extract prevents prediabetes and liver steatosis in high-fat-fed aging mice. *Journal of functional foods*, 1756-4646.

Leite-Legatti, A. V., Batista, Â. G., Dragano, N. R. V., Marques, A. C., Malta, L. G., Riccio, M. F., et al. (2012). Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. *Food Research International*, *49*, 596–603.

Lenquiste, S. A., Batista, Â. G., Marineli, R. d. S., Dragano, N. R. V., & Jr., M. R. M. (2012). Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol andimproves insulin resistance in obese rats. *Food Research International*, 49, 153–160.

Liu, C., Ma, J., Sun, J., Cheng, C., Feng, Z., Jiang, H., et al. (2017). Flavonoid-Rich Extract of Paulownia fortunei Flowers Attenuates Diet-Induced Hyperlipidemia, Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Obesity Mice by AMPK Pathway. *Nutrients*, *9*(9).

Luna-Vital, D., Weiss, M., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Anthocyanins from Purple Corn Ameliorated Tumor Necrosis Factor-α-Induced Inflammation and Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes via Activation of Insulin Signaling and Enhanced GLUT4 Translocation. *Molecular Nutrition & Food Research*, *61*(12).

Mondul, A. M., Weinstein, S. J., Virtamo, J., & Albanes, D. (2011). Serum total and HDL cholesterol and risk of prostate cancer. *Cancer Causes Control*, 22(11), 1545-1552.

Moon, C. M., Oh, C. H., Ahn, K. Y., Yang, J. S., Kim, J. Y., Shin, S. S., et al. (2017). Metabolic biomarkers for nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet: In vivo magnetic resonance spectroscopy of hyperpolarized [1-. *Biochemical Biophysical Research Communications, 482*(1), 112-119.

Nogueira Pangrazi, E., da Silva, R. F., Kido, L. A., Montico, F., & Cagnon, V. H. A. (2018). Nintedanib treatment delays prostate dorsolateral lobe cancer progression in the TRAMP model: contribution to the epithelial-stromal interaction balance. *Cell Biology International*, *42*(2), 153-168.

Pettinelli, P., & Videla, L. A. (2011). Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. *J Clin Endocrinol Metab*, *96*(5), 1424-1430.

Plaza, M., Batista, Â., Cazarin, C. B., Sandahl, M., Turner, C., Östman, E., et al. (2016). Characterization of antioxidant polyphenols from Myrciaria jaboticaba peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: A pilot clinical study. *Food Chemisryt*, *211*, 185-197.

Ponziani, F. R., Pecere, S., Gasbarrini, A., & Ojetti, V. (2015). Physiology and pathophysiology of liver lipid metabolism. *Expert Review Gastroenterology Hepatology*, *9*(8), 1055-1067.

Qin, Y., Xia, M., Ma, J., Hao, Y., Liu, J., Mou, H., et al. (2009). Anthocyanin supplementation improves serum LDLand HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *Americal Journal of Clinical Nutrition*, *90*(3), 485-492.

Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, *123*(11), 1939-1951.

Russo, G. I., Cimino, S., Fragalà, E., Privitera, S., La Vignera, S., Condorelli, R., et al. (2015). Relationship between non-alcoholic fatty liver disease and benign prostatic hyperplasia/lower urinary tract symptoms: new insights from an Italian cross-sectional study. *World Journal of Urology*, *33*(5), 743-751.

Sabrina Alves Lenquiste, Celina de Almeida Lamas, Rafaela da Silva Marineli, Érica Aguiar Moraes, Patrícia Cristine Borck, Rafael Ludemann Camargo, et al. (2018). Jaboticaba peel powder and jaboticaba peel aqueous extract reduces obesity, insulin resistance and hepatic fat accumulation in rats. *Food Research International*.

Schnoeller, T. J., Jentzmik, F., Schrader, A. J., & Steinestel, J. (2017). Influence of serum cholesterol level and statin treatment on prostate cancer aggressiveness. *Oncotarget*, 8(29), 47110-47120.

Smith, K. B., & Smith, M. S. (2016). Obesity Statistics. Prim Care, 43(1), 121-135, ix.

Souza-Mello, V. (2015). Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology*, *7*(8), 1012-1019.

Suburu, J., & Chen, Y. Q. (2012). Lipids and prostate cancer. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 98(1-2), 1-10.

Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 25*(1), 16-27.

Tucakovic, L., Colson, N., Santhakumar, A. B., Kundur, A. R., Shuttleworth, M., & Singh, I. (2018). The e ff ects of anthocyanins on body weight and expression of adipocyte 's hormones: Leptin and adiponectin. *Journal of Functional Foods*, *45*, 173-180.

van der Heijden, R. A., Morrison, M. C., Sheedfar, F., Mulder, P., Schreurs, M., Hommelberg, P. P., et al. (2016). Effects of Anthocyanin and Flavanol Compounds on Lipid Metabolism and Adipose Tissue Associated Systemic Inflammation in Diet-Induced Obesity. *Mediators of Inflammation*, 2016, 2042107.

Warner Finstad, Raimundas Galiauskas, James Cook, K. M., Derbrenn O'Connor, Eoin O Sullivan, Geraldine Markey, et al. (2018). Prevalence of overweight and prediabetes in men receiving systemic therapies for metastatic prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *36* : 6_suppl 289-289.

Xu, H., Jiang, H. W., & Ding, Q. (2015). Insulin-Like growth factor 1 related pathways and high-fat diet promotion of transgenic adenocarcinoma mouse prostate (TRAMP) cancer progression. *Actas Urol Esp*, *39*(3), 161-168.

Zadra, G., Photopoulos, C., & Loda, M. (2013). The fat side of prostate cancer. *Biochimica Biophysica Acta*, 1831(10), 1518-1532.



Figure 7: Grafic Abstract

Parte II

Material e métodos e demais resultados e discussões que farão parte de mais 2 artigos científicos sendo um relacionado às análises com extrato da casca da jabuticaba e o outro referente às análises com berberina

O artigo referente ao extrato da casca da jabuticaba e próstata se encontra em fase final de redação recebendo o título de: "Effects of Brazilian berry on the prostate cancer microenvironment: the greater the cellular disorders, the greater the positive tissue responses". Possível periódico: Life Sciences

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e Procedimento Experimental

No presente estudo foram utilizados 138 camundongos machos transgênicos da linhagem TRAMP (C57BL/6-Tg (TRAMP) 8247/Ng/J X FVB/Unib/F1/J) obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/ UNICAMP). Todos os animais obtidos do CEMIB receberam água e ração *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil) e foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Celular e Estrutural (Área de Anatomia) do Instituto de Biologia até atingirem a idade experimental para cada grupo de tratamento. Todos os cruzamentos e tipagem genotípica para garantir que ocorreu a instalação da transgene foram realizados no CEMIB/UNICAMP. Os camundongos da linhagem TRAMP foram importados da *The Jackson Laboratory* com posterior instalação da colônia no CEMIB/UNICAMP com financiamento da FAPESP. Os animais foram divididos entre os seguintes grupos experimentais (CEUA: 4323-1).

Grupo comum aos tratamentos com ECJ e berberina

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

Grupos experimento ECJ

• <u>Grupo controle dieta normolipídica (C16)</u>: Camundongos TRAMP que receberam água e ração Nuvilab® *ad libitum* até 8 semanas de idade. A partir de 8 semanas de idade os animais receberam dieta AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993; Nogueira-Lima *et al.*, 2019) *ad libitum* e foram tratados com 5 doses semanais de água, via gavagem, simulando as mesmas condições experimentais do tratamento com o ECJ, sendo posteriormente eutanasiados com 16 semanas de idade (n=17 animais).

• <u>Grupo controle dieta hiperlipídica (CH16)</u>: Camundongos TRAMP que receberam água e ração Nuvilab® *ad libitum* até 8 semanas de idade. A partir de 8 semanas de idade os animais receberam dieta hiperlipídica (Batista, A. G. *et al.*, 2014; Nogueira-Lima *et al.*, 2019) e foram tratados com 5 doses semanais de água, via gavagem, simulando as mesmas condições experimentais do tratamento com o ECJ, sendo posteriormente eutanasiados com 16 semanas de idade (n=17 animais).

• <u>Grupo jabuticaba dieta normolipídica (JC)</u>: Camundongos TRAMP que receberam água e ração Nuvilab® *ad libitum* até 8 semanas de idade. A partir de 8 semanas de idade os animais receberam dieta AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993; Nogueira-Lima *et al.*, 2019) *ad libitum* e foram tratados com 5 doses semanais de ECJ (5,8g de extrato da casca/g de animal/dia (modificado de Lamas *et al.*, 2018), via gavagem, sendo posteriormente eutanasiados com 16 semanas de idade (n=17 animais).

• <u>Grupo jabuticaba dieta hiperlipídica (JH)</u>: Camundongos TRAMP que receberam água e ração Nuvilab® *ad libitum* até 8 semanas de idade. A partir de 8 semanas de idade os animais receberam a dieta hiperlipídica (Batista, A. G. *et al.*, 2014; Nogueira-Lima *et al.*, 2019) *ad libitum* e foram tratados com 5 doses semanais de ECJ (5,8g de extrato da casca/g de animal/dia (modificado de Lamas *et al.*, 2018, via gavagem, sendo posteriormente eutanasiados com 16 semanas de idade (n=17 animais).



Figura 3: Grupos experimentais ECJ.

Grupos experimento berberina

• <u>Grupo controle dieta normolipídica (C12)</u>: Camundongos TRAMP que receberam água e ração Nuvilab® *ad libitum* até 8 semanas de idade. A partir de 8 semanas de idade os animais receberam ração AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993; Nogueira-Lima *et al.*, 2019) *ad libitum*, sendo posteriormente eutanasiados com 12 semanas de idade (n=10 animais).

• <u>Grupo controle dieta hiperlipídica (CH12)</u>: Camundongos TRAMP que receberam água e ração Nuvilab® *ad libitum* até 8 semanas de idade. A partir de 8 semanas de idade os animais receberam dieta hiperlipídica (Batista *et al.*, 2014; Nogueira-Lima *et al.*, 2019) *ad libitum*, sendo posteriormente eutanasiados com 12 semanas de idade (n=10 animais).

• <u>Grupo controle dieta normolipídica DMSO (C16D)</u>: Camundongos TRAMP que receberam água e ração Nuvilab® *ad libitum* até 8 semanas de idade. A partir de 8 semanas de idade os animais receberam ração AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993; Nogueira-Lima *et al.*, 2019) *ad libitum* e a partir de 12 semanas de idade foram tratados com 2 doses semanais de dimetilsulfóxido (DMSO), via intraperitoneal, simulando as mesmas condições experimentais do tratamento com a berberina, sendo posteriormente eutanasiados com 16 semanas de idade (n=10 animais).

•<u>Grupo controle dieta normolipídica DMSO (CH16D)</u>: Camundongos TRAMP que receberam água e ração Nuvilab® *ad libitum* até 8 semanas de idade. A partir de 8 semanas de idade os animais receberam dieta hiperlipídica (Batista *et al.*, 2014; Nogueira-Lima *et al.*, 2019) *ad libitum* e a partir de 12 semanas de idade foram tratados com 2 doses semanais de dimetilsulfóxido (DMSO), via intraperitoneal, para simular as mesmas condições experimentais do tratamento com berberina, sendo posteriormente eutanasiados com 16 semanas de idade (n=10 animais).

• <u>Grupo berberina dieta normolipídica (BC)</u>: Camundongos TRAMP que receberam água e ração Nuvilab® *ad libitum* até 8 semanas de idade. A partir de 8 semanas de idade os animais receberam dieta AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993; Nogueira-Lima *et al.*, 2019) *ad libitum* e a partir de 12 semanas de idade foram tratados com 2 doses semanais de berberina (5 mg/kg de animal/dia), via intraperitoneal, sendo eutanasiados com 16 semanas de idade (n=10 animais).

• <u>Grupo berberina dieta hiperlipídica (BH)</u> Camundongos TRAMP que receberam água e ração Nuvilab® *ad libitum* até 8 semanas de idade. A partir de 8 semanas de idade os animais receberam dieta hiperlipídica (Batista *et al.*, 2014; Nogueira-Lima *et al.*, 2019) *ad libitum* e a partir de 12 semanas de idade foram tratados com 2 doses semanais de berberina (5 mg/kg de animal/dia), via intraperitoneal, sendo eutanasiados com 16 semanas de idade (n=10 animais).



Figura 4: Grupos experimentais berberina.

Após atingirem as idades determinadas nos diferentes grupos experimentais, os animais foram pesados em balança analítica *Denver P-214 (Denver Instrument Company, Arvada, CO, EUA)* e 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*). Os animais destinados às análises de morfologia em microscopia de luz, imunohistoquímica e *western blotting* foram eutanasiados através do

aumento gradativo dos níveis de anestesia. O sangue desses animais foi coletado em e*ppendorff* contendo heparina e centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos para obtenção do plasma e realização dos ensaios de TBARS e atividade enzimática. Os animais referentes aos experimentos de qRT-PCR e hibridização *in situ* foram submetidos a perfusão com solução salina. Em seguida, amostras do LDL da próstata foram coletadas.

4.2 Preparação das Dietas Normolipídica e Hiperlipídica

A dieta padrão ou normolipídica e a dieta hiperlipídica (DH) foram preparadas no laboratório do Prof° Dr° Mário Roberto Maróstica Jr. (FEA-UNICAMP). De acordo com artigo já publicado (Nogueira-Lima *et al.*, 2019) e os seguintes autores: BATISTA, A.G. *et al*, 2014; GOENA, M. *et al*, 89; REEVES, P.G. *et al*, 1993. A ração hiperlipídica apresentou alto teor de lipídios (31%) e foi administrada aos camundongos dos grupos CH12, CH16, CH16D, JH e BH (Batista, A. G. *et al.*, 2014). Já os animais dos grupos C12, C16, C16D, JC e BC, receberam ração AIN-93M conforme descrito pelos seguintes autores: GOENA, M. *et al*, 89; REEVES, P.G. *et al*, 1993, com conteúdo normal de lipídio (5% em peso) e adaptação do conteúdo proteico (12%), segundo (Goena *et al.*, 1989), pelo mesmo período de tempo . As composições das dietas podem ser observadas na tabela 1.

Ingredientes (g/kg)	Dieta normolipídica	Dieta hiperlipídica
Caseína	143,7	143,7
Amido de milho	462	152
Maltodextrina	155	155
Sacarose	100	100
Fibras (celulose)	50	50
Óleo de soja	40	40
Banha		310
Mix mineral (AIN93M)	35	35
Mix vitamínico (AIN93VX)	10	10
L-cistina	1,8	1,8
Bitartarato de colina	2,5	2,5
Tert-butilhidroquinona	0,008	0,008
Total	1000	1000
Densidade energética(Kcal/g)	3,8	5,35

Tabela 1 – Composição das dietas AIN-93M modificada (normolipídica) e hiperlipídica

(Nogueira-Lima *et al.*, 2019), (Batista *et al.*, 2014) Modificada de (Goena *et al.*, 1989; Reeves *et al.*, 1993).

4.3 Extrato da casca da jabuticaba (Myrciaria jaboticaba Vell Berg)

4.3.1 Avaliação dos compostos do extrato da casca da jabuticaba

Os compostos bioativos do extrato da casca de jabuticaba (ECJ) foram avaliados em todas as preparações do mesmo, antecedendo a administração para os camundongos.

Tabela 2 – Média das análises dos componentes bioativos do ECJ.

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

4.3.2 Determinação da dose do extrato da casca da jabuticaba

A determinação da dose do ECJ foi baseada na quantidade de fenólicos totais, como parâmetro para realização do cálculo para atingir 5.8 g de ECJ por kilograma de peso do animal. A dose de 5.8g/Kg do ECJ está de acordo com outro estudo prévio do nosso grupo de pesquisa (Lamas *et al.*, 2018) e com o artigo já publicado proveniente da presente tese (Nogueira-Lima *et al.*, 2019). A análise completa da qualidade e quantidade de compostos bioativos presentes no extrato (ou seja, a caracterização), bem como sua capacidade antioxidante *in vitro* foi previamente realizada no Laboratório de Nutrição e Metabolismo em parceria com Prof^o Dr^o Mário Roberto Maróstica Jr. (FEA-UNICAMP) (Lamas *et al.*, 2018).

4.3.3 Preparação do extrato da casca da jabuticaba

A metodologia para preparação do ECJ consiste na solubilização da casca de jabuticaba liofilizada e posterior remoção do solvente, segundo Maróstica, 2017. Essa metodologia foi patenteada e licenciada, de forma que não estamos autorizados a fornecer maiores detalhes sobre o procedimento de extração e preparo do extrato. Contudo, as informações permitidas constam no artigo de Lamas et al., 2018.

4.3.4 Tratamento com a berberina

O cloreto de berberina foi obtido comercialmente da SIGMA-ALDRICH Brasil. Para o tratamento foram administrados 5 mg/kg de animal/dia, diluído em 30µ1 de dimetilsulfóxido (DMSO) via intraperitoneal, sendo 2 aplicações por semana durante 4 semanas segundo (Choi *et al.*, 2009).

4.4 Microscopia de Luz

Amostras do LDL da próstata de 5 animais dos grupos experimentais de jabuticaba e berberina foram coletadas e fixadas em solução de Bouin (Brent H. Dorsett and Ioachim, 1978). Após a fixação, os tecidos foram lavados em álcool etílico a 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Em seguida, os fragmentos foram diafanizados em xilol por 40 minutos e inclusos em polímeros plásticos (*Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA*). Posteriormente, os materiais foram seccionados de forma semiseriada no micrótomo *Hyrax M60 (Zeiss, Munique, Alemanha)* com espessura de 5µm, corados em Hematoxilina-Eosina e ou Tricrômico de Masson (Junqueira *et al.*, 1979) e fotografados no fotomicroscópio *Nikon Eclipse E-400 (Nikon, Tóquio, Japão*).

Para a análise morfológica foram ultilizados 8 regiões aleatórias dos cortes histológicos de cada animal, marcando-se quatro quadrantes em cada região. Em cada quadrante, o tecido prostático foi classificado em: epitélio normal, neoplasia intraepitelial prostática (NIP) de baixo grau, NIP de alto grau e adenocarcinoma bem-diferenciado. Ao final, um total de 160 quadrantes foi analisado por grupo (Da Silva *et al.*, 2017; Nogueira Pangrazi *et al.*, 2018).

Afim de detectar possíveis alterações no padrão de lesões dos animais controles tratados com DMSO para as análises com berberina, analisamos qualitativamente 3 animais TRAMP submetidos ou não à DH, com 16 semanas de idade e comparamos com 3 animais TRAMP, submetidos ou não à DH, que receberam tratamento com DMSO.

4.5 Determinação de proliferação celular via imunomarcação de PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)

As mesmas amostras prostáticas usadas para a microscopia de luz foram submetidas a análise de imunohistoquímica. O índice proliferativo foi obtido por imunomarcação do antígeno PCNA, localizado através do anticorpo monoclonal *mouse* (SC65598) (Santa Cruz Biotchenollogy, USA). Posteriormente, um retículo de 702 pontos foi utilizado, proveniente do programa *Image Pro Plus*, para contagem dos pontos correspondentes a imunomarcação positiva em 8 imagens aleatórias por animal de cada grupo experimental (Da Silva *et al.*, 2017).

4.6 Imunohistoquímica

As mesmas amostras prostáticas usadas para a microscopia de luz foram submetidas às análises de imunohistoquímica. Estas foram seccionadas com 5 µm de espessura no micrótomo (Hyrax M60, Zeiss, Alemanha) e coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação

dos cortes histológicos em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C por 15 minutos em 60icro-ondas (potência de 750 W) ou tratamento com proteinase K, dependendo das características de cada anticorpo. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H₂O₂ (0,3% em metanol) por 15 minutos, com posterior incubação em solução bloqueadora com albumina soro bovino (3%), em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os antígenos VEGF, CD31, TGF\u00b31, foram localizados através dos anticorpos: monoclonal mouse (sc-53462) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) para VEGF; policlonal rabbit H0410 (SC-1506) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) para CD31 e policlonal rabbit (SC-146) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) para TGFβ1, diluídos (1:50) em BSA 1% e armazenados overnight a 4 °C. O kit Envision HRP (Dako Cytomation Inc., Carpenteria, CA, USA) foi usado para detecção dos antígenos, de acordo com as instruções do fabricante. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário HRP conjugado proveniente do kit Envision (Dako) por 40 minutos e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB). Para a contra-coloração destes foi utilizada Hematoxilina de Harris. As lâminas foram desidratadas, montadas e avaliadas no fotomicroscópio Nikon Eclipse E-400 (Nikon, Tóquio, Japão). Os cortes prostáticos de cada grupo foram avaliados através do precipitado acastanhado de DAB, o qual indica a imunoreatividade dos anticorpos.

Para a quantificação de imunoreatividade 8 regiões aleatórias do LDL da próstata foram utilizadas de 5 animais de cada grupo experimental e submetidos a imunohistoquímica de cada molécula, e avaliados sob objetiva de 40X. Os tecidos prostáticos foram avaliados no fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400), utilizando o programa Nis-Elements: Advanced Research (USA). Posteriormente, um retículo de 702 pontos foi utilizado, proveniente do programa *Image Pro Plus*, para contagem dos pontos correspondentes a imunomarcação positiva (modificado de (Da Silva *et al.*, 2017; Nogueira Pangrazi *et al.*, 2018).

4.7 Análise da densidade de microvasos (DMV)

A determinação da densidade de microvasos foi realizada através da contagem da frequência de marcação positiva da imunohistoquímica de CD31 em vasos sanguíneos de 8 imagens aleatórias provenientes de 5 animais de cada grupo experimental, conforme o critério de (Weidner et al., 1993). A densidade de microvasos foi expressa através da média obtida após o procedimento de contagem e do ponto de maior contagem de vasos (ponto de máxima vascularização) (Hochberg et al., 2002).

4.8 Western Blotting

Amostras do LDL da próstata de 5 animais dos grupos experimentais de jabuticaba foram coletadas e armazenadas em biofreezer a -80°C até o momento do uso. Posteriormente foram pesadas e homogeneizadas. Uma alíquota de cada amostra foi usada para determinação da concentração de proteínas, através do reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif., USA). Amostras foram misturadas (1:1) com tampão de amostra 3X (100Mm Tris-HCl Ph 6.8, 10% β-mercaptoetanol, 4% SDS and 20% glycerol), incubadas em banho seco a 95°C por 5 minutos. O correspondente a 50 microgramas de proteína foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente (Sistema Hoefer) para membranas de nitrocelulose (Amersham) a 120 V por 90 minutos. As membranas foram bloqueadas com 3% BSA diluído em TBS-T por uma hora e incubadas com os seguintes anticorpos primários: monoclonal mouse (sc-53462) (Santa Cruz Biotechnology, CA) para VEGF; policlonal rabbit (sc-146) (Santa Cruz Biotechnology) para TGF^β1, policlonal rabbit (L9393) (Sigma- Aldrich) para laminina 10 (α1), *policlonal rabbit* (HPA001814 –*SIGMA*®) para SOD2, monoclonal mouse (C0979 SIGMA® para catalase, policlonal goat (sc-130083) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) para 4HNE, SAB210083-SIGMA® para GR; na diluição 1:500. Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários anti-rabbit, anti-mouse ou anti-goat na diluição de 1:2000 em 1% BSA. Após nova série de lavagens com TBS-T, a atividade da peroxidase foi detectada usando solução Luminol (Pierce Cruz Biotechnology, Rockford, IL) e capturada através do equipamento Gnome e software Gene Sys image (Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK). O anticorpo monoclonal mouse anti-β-actina, (sc- 81178) (Santa Cruz Biotechnology, CA) para β-actina foi usado como controle endógeno. As intensidades das bandas foram determinadas usando o programa Image J (Image Analysis and Processing in Java).

4.9 Atividade da glutationa redutase (GR)

A atividade da GR foi medida em 4 amostras plasmáticas de cada um dos grupos referentes ao ECJ. A diminuição da absorbância em 340 nm induzida por oxidação da glutationa na presença de NADPH em tampão fosfato. A reação foi analizada pelo equipamento *Multimode Microplate Reader Synergy-Biotek*, e o programa *Gen 5*. Os resultados foram expressos como nmol NADPH consumido/min (Carlberg eMannervik, 1985).

4.10 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os níveis de TBARS no plasma sanguíneo foram determinados utilizando-se amostras de 4 animais de cada grupo experimental referente ao tratamento com ECJ e berberina. Estas foram mixadas com

8,1% de dodecil sulfato de sódio, TBA (2- ácido tiobarbitúrico), 20% ácido acético e 5% hidróxido de sódio. Após a mistura, as amostras foram mantidas a 100 °C por 1 hora. Em seguida, as amostras foram imediatamente submetidas no gelo para resfriar e foram centrifugadas a 9503 g durante 10 minutos a 4 °C. Com o término da centrifugação, 150 μ l do sobrenadante foi adicionado em triplicatas em microplaca de 96 poços e submetido a leitura de absorbância de 532 mn para a quantificação do MDA (malomaldeído) – TBA. Para a leitura, equipamento *Multimode Microplate Reader Synergy- Biotek* foi utilizadobem como o programa *Gen 5*. A curva padrão foi preparada utilizando-se o MDA padrão. Os resultados foram expressos como nmol Ml⁻¹ (Ohkawa *et al.*, 1979).

4.11 Atividade da superóxido dismutase total (SOD)

Amostras plasmáticas provenientes de 4 animais dos diferentes grupos experimentais referentes ao tratamento com ECJ e berberina foram diluídas em tampão fosfato 0,1M, das quais 150 μ l foram adicionadas em microplaca de 96 poços em duplicatas. Em seguida, 150 μ l de solução (0.1 mmol L_1 hypoxanthine, 0.07 uxanthineoxidase e 0.6 mmol L_1NTB em fosfato na proporção de 1:1:1) foi adicionada a microplaca e esta foi submetida a leituras de 560 nm por 10 minutos intercalados por intervalos de 1 minuto. Para tanto, utilizou-se o equipamento *Multimode Microplate Reader Synergy-Biotek*, e o programa *Gen 5*. Os resultados da atividade da SOD foram expressos como U ml⁻¹ (Winterbourn *et al.*, 1975).

4.12 Atividade da catalase

A atividade enzimática da catalase foi determinada usando o plasma de 4 animais dos grupos experimentais referentes ao tratamento com ECJ e berberina. As amostras foram incubadas em duplicatas com o substrato (65 mmol/ml de H₂O₂ em 65 mmol/ml de tampão fosfato sódio/potássio) a 37 °C durante 3 minutos em microplaca de 96 poços. Em seguida, a reação foi interrompida através da adição de molibdato de amônio e o complexo amarelado formado foi lido a 374 nm. A reação foi analizada pelo equipamento *Multimode Microplate Reader Synergy- Biotek*, e o programa *Gen 5*. Os resultados foram expressos como Ku Ml⁻¹ (Hadwan e Abed, 2016).

4.13 Atividade da glutationa peroxidase total (GPx)

Para a análise da atividade da GPx foram utilizadas amostras plasmáticas de 4 animais dos grupos experimentais referentes ao tratamento com a berberina. Foi realizada indução da atividade enzimática com 0,25 mmol L de H_2O_2 na presença de 10 mmol L 1 de glutationa, 4 mmol L 1 NADPH (bnicotinamida adeninadinucleotídeo 20-fosfato hidratado de sal tetrassódico reduzido) e com a atividade da enzima GR (glutationa redutase). O consumo de NADPH foi monitorado por 10 minutos intercalados por intervalos de 1 minuto com a absorbância de 365 nm. O ensaio foi realizado em duplicatas utilizandose microplaca de 96 poços. A reação foi analizada pelo equipamento *Multimode Microplate Reader Synergy- Biotek*, e o programa *Gen 5*. Os resultados foram expressos como nmol NADPH consumidos por min 1/ml (Batista *et al.*, 2014).

4.14 Extração de RNA

Amostras do lobo dorsolateral de 4 animais dos diferentes grupos experimentais referentes ao tratamento com ECJ foram tripsinizadas e adicionadas a tubos livres de Rnase contendo 1 MI de TRIzol® (Invitrogen). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em *pool* e incubadas à temperatura ambiente por 5 min com posterior adição de 200 MI de clorofórmio. A seguir, as amostras foram agitadas por 15 segundos e permaneceram em temperatura ambiente por 3 min. Ao final desse tempo, as mesmas foram centrifugadas por 15 min a 12.000 rpm a 4°C. Este último procedimento teve por finalidade, que ao término desta etapa, a fase aquosa fosse removida e transferida para um novo tubo de 1,5 MI. Em seguida, 500 MI de isopropanol foram adicionados nos tubos e estes permaneceram em temperatura ambiente por 10 min. Após esse período, as amostras foram novamente submetidas a centrifugação a 12.000 rpm a 4°C por 10 min e o sobrenadante foi descartado para a adição de 1 MI de etanol 70% gelado. Em seguida, uma nova centrifugação foi realizada a 7.000 rpm a 4°C por 5 min e o *pellet* foi ressuspendido em 20µI de água tratada com DEPC e estocado a -80°C (Mraz *et al.*, 2009).

4.15 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de Cdna, o *Kit High-Capacity Cdna reverse Transcription (Applied Biosystems)* foi utilizado. Para cada reação, 1µg do RNA total obtido das amostras em *pool* foi utilizado, acrescido de 2 Ml de *primer* oligo (Dt) (0.2 µg/Ml), 4,2 Ml de água tratada com DEPC, 2 Ml de Buffer 5X (250 Mm Tris-HCl Ph 8.3, 250 Mm KCl, 20 Mm MgCl2, 50 Mm DTT), 0,8 Ml de Dntp Mix (10Mm) e 1 Ml da enzima Transcriptase Reversa (200u/ Ml). A reação foi realizada em termociclador (Eppendorf) através das seguintes condições: 1 ciclo de 25° C – 10 min, 1 ciclo de 37° C – 120 min, 1 ciclo de 85° C – 5 min.

4.16 Desenho de primers para DACT1

A fim de quantificar a expressão do gene *DACT1* no LDL da próstata, foram utilizados os *primers* direto e reverso listados na tabela 1, nas amostras dos animais referentes ao experimento com ECJ. Estes primers foram desenhados a partir do *Primer Blast tool-NCBI*.

Tabela 1: Sequências dos primers

Gene	Primer Direto	Primer Reverso	Amplicon
DACT1	GGTTTTATGAGCTGAGTGATGG	GGTTTATTGGTCCTTACAGGG	494 pb

4.17 Real-time PCR

As reações de *q-PCR* foram realizadas em *pool* de 4 animais dos diferentes grupos experimentais referentes ao tratamento com ECJ e em duplicata técnica. Para as reações, foram utilizadas as indicações fornecidas pelo fabricante. Para cada reação foram utilizados 5 Ml de *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 1 Ml de Cdna (400ng/Ul), 3,5 Ml de água DEPC e 1 Ml de *primer* F+R (3Mm). As reações foram realizadas em placas *MicroAmp*® *Optical 96-well Reaction Plate* (Applied Biosystems ref. N8010560) compatíveis para o termociclador Applied Biosystems 7300, com o programa nas seguintes etapas: 1 ciclo de 50° C – 2 min e 95° C – 10 min, seguidos de 45 ciclos de 95° C – 15s, 60° C – 1 min. Os resultados foram normalizados utilizando os valores de Ct (*threshold cycle*) do gene *GAPDH* na mesma placa. Para quantificar a expressão gênica relativa, foi utilizado o modelo matemático 2- $\Delta\Delta$ Ct, considerando o grupo C como calibrador.

4.18 Hibridização in situ

Amostras do lobo dorsolateral de 3 animais dos grupos experimentais referentes ao tratamento com ECJ foram coletadas e fixadas em paraformaldeído. Posteriormente os materiais foram seccionados no micrótomo *Hyrax M60 (Zeiss, Munique, Alemanha)* com espessura de 7µm. Em seguida, as lâminas foram desparafinizadas em estufa a 60 °C por 3 horas submetidas a dois banhos de xilol seguidos de uma série decrescente de álcool (100-50%) e lavadas em PBS. Posteriormente, as lâminas foram deixadas em solução de digestão (Proteinase K) durante 7 minutos a 37°C. Após, as lâminas foram incubadas por 10 minutos a 37°C em solução de glicina 0,2% e refixadas em PFA 4% por 5 minutos com posterior lavagem em PBS. Em seguida, as lâminas foram submetidas a solução de préhibrididação, e mantidas em câmara úmida a 65°C durante 1 hora. Logo após, as lâminas foram incubadas com a solução de hibridização, contendo as sondas de RNA antisenso o gene de interesse, e

mantidas *overnight* a 65°C. Na manhã seguinte, as lâminas foram lavadas com tampão SSC 1x e com solução X a 65°C As lâminas foram, então, submetidas a lavagens com PBT com MABT, tendo cada lavagem duração de 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com BBR/MABT 2% por uma hora. A imunodetecção foi realizada no escuro, em câmara úmida *overnight* com anticorpo anti-DIG conjugado com fosfatase alcalina diluído 1:2000 na solução BBR/MABT 5%. Na manhã seguinte as lâminas foram submetidas a lavagens em MABT e em NTMT para em seguida serem incubadas no escuro com solução de revelação (2,5 Ml NBT/BCIP por Ml de NTMT). Após o término da coloração, as lâminas foram montadas com lamínulas e glicerol 80%, analisadas e fotografadas (Modificado de (Lewis *et al.*, 1985)).

4.19 Análise Estatística

Os parâmetros quantificados nas análises de morfologia, imunohistoquímica, *western blotting*, TBARs, atividades enzimáticas e Q*rt-PCR* foram analisados estatisticamente para os diferentes grupos experimentais. Para tal, o Teste t-Student ou Anova seguido de Tukey foram empregados. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5% no Software *GraphPad Prism* 5.0 (*GraphPad Software*, Inc., La Jolla, CA, USA) (Zar, 1999).

5. RESULTADOS

5.1 Resultados referentes ao tratamento com ECJ

5.1.1 Análise morfológica

Grupos controles: Efeito da DH e progressão tumoral

A análise morfológica demonstrou que o grupo controle de 8 semanas de idade apresentou ácinos prostáticos com moderados pregueamentos do epitélio glandular em direção ao lúmen (Figura 5 a). O epitélio se mostrou simples com células colunares, núcleos basais e nucléolo proeminente (Figura 5 a). O estroma apresentou elementos fibrilares (EF) e fibras musculares lisas (FML) delgadas, as quais se encontraram dispostas ao redor dos ácinos (Figura 5 h). Áreas de proliferação celular de baixo e alto grau e adenocarcinoma bem-diferenciado (ABD) foram observadas, porém com baixa frequência relativa em relação aos demais grupos controles (Figura 5 a-c, h, 6 e 7). O grupo controle C16 apresentou morfologia geral, tanto acinar como estromal, semelhante à encontrada no grupo C8 (Figura 5 b-c, i). Contudo, maior frequência de áreas de proliferação celular foi caracterizada, nas quais as células se apresentavam em epitélio estratificado com nucléos proeminentes e cromatina menos condensada (Figura 5 c, i). Ainda,

aumento de NIP de alto grau e de ABD (Figura 5 c-d) foi identificado no grupo C16. Com relação ao grupo controle CH, este apresentou aspecto morfológico geral similar aos grupos controles descritos anteriormente (Figura 5 d, j). Entretanto, a frequência relativa do epitélio saudável diminuiu em relação aos demais grupos controles e o estroma foi caracterizado com hipertrofia e hiperplasia (Figura 5 j, 7 a). Ainda, diminuição significativa de NIP de baixo grau e aumento tanto da NIP de alto grau foi identificada, bem como de ABD nesse grupo (Figura 5 e, 6 b-d).

Grupos tratados: Efeito do tratamento com o ECJ

O tratamento com ECJ promoveu aumento da frequência do epitélio saudável tanto no grupo JC como no JH (Figura 5 f-g, 7 a). Contudo, o grupo JH apresentou aumento com maior grau de significância estatística do que o grupo JC (p<0,01) (Figura 7 a). Além disso, diminuição de NIP de baixo grau foi identificada entre os grupos C16 e JC (Figura 7 b). Em adição, o tratamento proporcionou diminuição significativa de NIP de alto grau, ABD e diminuição do espessamento estromal no grupo JH (Figura 5 g, l; 7 c-d).



Figura 5: Fotomicrografias do LDL da próstata dos diferentes grupos experimentais. (C8 a) Epitélio saudável; (C16 b-c) NIP de baixo grau (seta fina-b); (CH- d) NIP de alto grau (EP). (CH- e) ABD (área demarcada) e (CH-j) EF (seta) e FML espessos; (JC-f) Aumento das áreas de epitélio saudável e (JC-k) elementos EF delgados. (JH-g) Diminuição de NIP de alto grau e (JH-l) diminuição do espessamento de EF e FML. Hematoxilina-Eosina (a-g); Tricrômico de Masson (h-l). Ep: epitélio, St: estroma, L: lúmen, EF: elementos fibrilares, FML: fibras musculares lisas. C8: grupo eutanasiado com 8 semanas de idade; C16: grupo dieta padrão; CH: grupo dieta hiperlipídica, JC: grupo dieta padrão jabuticaba; JH: grupo dieta hiperlipídica jabuticaba.



Figura 6: Frequência relativa do estadiamento das lesões e epitélio saudável. (a) Epitélio saudável; (b) NIP de baixo grau; (c) NIP de alto grau; (d) ABD. C8: grupo eutanasiado com 8 semanas de idade; C16: grupo dieta padrão; Teste t-Student com indicação de diferença estatística: (*): p≤0.5; (***): p≤0.001.



Figura 7: Frequência relativa do estadiamento das lesões e epitélio saudável. (a) Epitélio saudável; (b) NIP de baixo grau; (c) NIP de alto grau; (d) ABD. C16: grupo dieta padrão; CH: grupo dieta hiperlipídica, JC: grupo dieta padrão jabuticaba; JH: grupo dieta hiperlipídica jabuticaba. Anova seguido de Tukey com indicação de diferença estatística: (*): $p \le 0.5$; (**): $p \le 0.01$; (***): $p \le 0.001$, onde: (a) significante \neq C16, (b) significante \neq CH.

5.1.2 Análise de proliferação celular

Grupos controles: Efeito da DH e progressão tumoral

A análise de imunomarcação de PCNA confirmou os resultados obtidos na análise morfológica. Assim, aumento significativo deste marcador de proliferação foi verificado no grupo C16 em comparação o grupo C8 (Figura 8 a, b, f) e no grupo CH em relação ao C16 (Figura 8 b, c, g).

Grupos tratados: Efeito do tratamento com ECJ

Ainda, diminuição de proliferação foi observada após o tratamento com ECJ do grupo JH comparado ao CH, porém diferença estatística significativa entre os grupos C16 e JC não foi observada, embora se identifique a tendência de diminuição deste fator proliferativo (Figura 8 c-e, g).



Figura 8: Imunohistoquímica para PCNA. (a) C8: grupo eutanasiado com 8 semanas de idade; (b) C16: grupo dieta padrão; (c) CH: grupo dieta hiperlipídica; (d) JC: grupo dieta padrão jabuticaba; (e) JH: grupo dieta hiperlipídica jabuticaba. (f-g) Quantificação da imunomarcação de PCNA. Teste t-Student (f) e Anova seguido de Tukey (g) com indicação de diferença estatística: (*): $p \le 0.5$; (***): $p \le 0.001$, onde: (a) significante \neq C16, (b) significante \neq CH. Contra coloração com hematoxilina.

5.1.3 Análise do Estresse Oxidativo

Grupos controles: Efeito da DH e progressão tumoral

A análise da quantificação proteica demonstrou diminuição do nível da catalase e aumento da SOD2 entre os grupos C8 e C16 (Figura 9 A a-b). Os níveis de catalase, GR, SOD2 e 4HNE aumentaram com a ingestão da DH no grupo CH quando comparados ao grupo C16 (Figura 9 B a, b, c, d).

Grupos tratados: Efeito do tratamento com ECJ

Aumento da catalase e diminuição do GR foram caracterizados após a ingestão de ECJ no grupo JC em relação ao seu controle, grupo C16 (Figura 9 B a, b). Ainda, diminuição dos níveis proteicos da catalase, GR, SOD2 e 4HNE foi verificada no grupo JH quando comparado ao grupo CH (Figura 9 B a, b, c, d).



Figura 9: Análise dos níveis proteicos. A) (a) Níveis proteicos de catalase; (b) Níveis proteicos de SOD2; (c) Níveis proteicos de GR; (d) Níveis proteicos de 4HNE. Teste t-Student com indicação de diferença estatística: (**): $p \le 0.01$. B) (a) Níveis proteicos de catalase; (b) Níveis proteicos de SOD2; (c) Níveis proteicos de GR; (d) níveis proteicos de 4HNE. C8: grupo eutanasiado com 8 semanas de idade; C16: grupo dieta normolipídica; CH: grupo dieta hiperlipídica; JC: grupo dieta normolipídica jabuticaba. Anova seguido de Tukey com indicação de diferença estatística: (*): $p \le 0.5$; (**): $p \le 0.01$; (***): $p \le 0.001$, onde: (a) significante \neq C16, (b) significante \neq CH. Os resultados estão apresentados como porcentagem \pm desvio padrão em relação ao controle endógeno β -actina.

5.1.4 Peroxidação lipídica e atividade enzimática do estresse oxidativo

Grupos controles: Efeito da DH e progressão tumoral

A quantificação de TBARS plasmático mostrou diminuição significativa deste parâmetro no grupo C16 em relação ao grupo C8 (Figura 10 a). No entanto, diferenças significativas não foram verificadas entre os grupos C16 e CH (Figura 10 b). Com relação a enzima SOD, aumento de sua atividade foi observado no grupo C16 quando comparado ao grupo C8 (Figura 10 c) e no grupo CH quando comparado ao grupo C8 (Figura 10 d). Ainda, os valores da atividade enzimática da catalase reduziram significativamente no grupo C16 em relação ao grupo C8 (Figura 10 e) e aumentaram no grupo CH em relação ao grupo C16 (Figura 10 f).

Grupos tratados: Efeito do tratamento com ECJ

O tratamento com o ECJ não promoveu alteração significativa na peroxidação lipídica entre os grupos JC e JH e seus respectivos controles C16 e CH (Figura 10 b). No entanto, o ECJ diminuiu a atividade enzimática da SOD tanto no grupo JC como no JH em relação aos seus controles C16 e CH, respectivamente (Figura 10 d). Com relação à catalase, aumento de sua atividade foi observado no plasma dos animais do grupo JC quando comparado ao grupo C16 e diminuição no grupo JH em relação ao grupo CH (Figura 10 f).


Figura 10: Análises plasmáticas de peroxidação lipídica e atividade enzimática antioxidante. (a) e (b) peroxidação lipídica pelo método de TBARS. (c) e (d) atividade da superóxido dismutase total (SOD). (e) e (f) atividade da catalase. C8: grupo de 8 semanas de idade; C16: grupo dieta padrão; CH: grupo dieta hiperlipídica, JC: grupo dieta padrão jabuticaba; JH: grupo dieta hiperlipídica jabuticaba. (a, c, e) Teste t de *Student* e (b, d, f) Anova seguido de Tukey com indicação de diferença estatística: (*): p<0,5; (***): p<0,001, onde: (a) significante \neq C16, (b) significante \neq CH.

5.1.6 Avaliação da Matriz Extracelular

Grupos controles: Efeito da DH e progressão tumoral

A quantificação dos níveis proteicos de laminina mostrou diminuição desta molécula no grupo C16 em relação ao grupo C8 (Figura 11 a). Ainda, a ingestão da DH pelo grupo CH diminuiu a laminina neste grupo em relação ao grupo C16 (Figura 11 b). No que se refere a MMP9, esta aumentou de forma significativa com a progressão do PCa observada na comparação dos grupos C8 e C16 (Figura 12 a).

Com relação ao TGF β , aumento epitelial e estromal, além do total, se considerando os dois compartimentos, foi observado entre os grupos C8 e C16, o que foi confirmado pela análise do nível proteico por *western blotting* (Figura 13 A a, b, 14 B a-c, 13 a). Diferenças significativas não foram observadas para o TGF β , nos diferentes compartimentos prostáticos, entre os grupos C16 e CH (Figura 13 A b, c, 13 B d-f, 14 b).

Grupos tratados: Efeito do tratamento com ECJ

O tratamento com ECJ aumentou significativamente a laminina no grupo JH em relação ao CH, porém diferença não significativa foi verificada no grupo JC em comparação ao seu controle C16 (Figura 11 b), apesar do aumento numérico. Ainda, diminuição da MMP9 foi observada no grupo JH em comparação ao grupo CH (Figura 12 b). Com relação ao TGFβ, diminuição epitelial e estromal foi identificada no grupo JC em relação ao C16 (Figura 13 A b, d 13 B d-f) e diminuição do TGFβ estromal foi observada no grupo JH em comparação ao CH (Figura 13 A c, e, 13 B d-f). A análise de *western blotting* confirmou as observações da análise de imunohistoquímica (Figura 14 b).



Figura 11: Análise dos níveis proteicos de laminina. C8: grupo eutanasiado com 8 semanas de idade; C16: grupo dieta padrão; CH: grupo dieta hiperlipídica, JC: grupo dieta padrão jabuticaba; JH: grupo dieta hiperlipídica jabuticaba. Teste t-*Student* (a) e Anova seguido de Tukey (b) com indicação de diferença estatística: (**): p \leq 0.01, onde: (a) significante \neq C16, (b) significante \neq CH. Os resultados estão apresentados como porcentagem ± desvio padrão em relação ao controle endógeno β -actina.



Figura 12: Análise dos níveis proteicos de MMP9. a) C8: grupo eutanasiado com 8 semanas de idade; C16: grupo dieta padrão; CH: grupo dieta hiperlipídica, JC: grupo dieta padrão jabuticaba; JH: grupo dieta hiperlipídica jabuticaba. Teste t-*Student* (a) e Anova seguido de Tukey (b) com indicação de diferença estatística: (**): p \leq 0.01, onde: (a) significante \neq C16, (b) significante \neq CH. Os resultados estão apresentados como porcentagem \pm desvio padrão em relação ao controle endógeno β -actina.



Figura 13: Imunomarcação de TGF β (setas): A) Fotomicrografias: (a) C8: grupo eutanasiado com 8 semanas de idade; (b) C16: grupo dieta normolipídica; (c) CH: grupo dieta hiperlipídica; (d) JC: grupo dieta padrão jabuticaba; (e) JH: grupo dieta hiperlipídica jabuticaba. B) Quantificação de imunoreatividade total (a,d); epitelial (b,e) e estromal (e,f). Teste t-*Student* (a-c) e Anova seguido de Tukey (d-f) com indicação de diferença estatística: (*): p ≤ 0.5 ; (**): p ≤ 0.01 ; (***): p ≤ 0.001 , onde: (a) significante \neq C16, (b) significante \neq CH. Contra coloração com hematoxilina.



Figura 14: Análise dos níveis proteicos de TGF β . a) C8: grupo eutanasiado com 8 semanas de idade; C16: grupo dieta padrão; CH: grupo dieta hiperlipídica, JC: grupo dieta padrão jabuticaba; JH: grupo dieta hiperlipídica jabuticaba. Teste t-*Student* (a) e Anova seguido de Tukey (b) com indicação de diferença estatística: (*): p \leq 0.5; (***): p \leq 0.001, onde: (a) significante \neq C16. Os resultados estão apresentados como porcentagem ± desvio padrão em relação ao controle endógeno β -actina.

5.1.7 Avaliação da angiogênese

Grupos controles: Efeito da DH e da progressão tumoral

A análise da imunoreatividade e níveis proteicos do VEGF mostrou diferença significativa entre os grupos C8 e C16 e aumento da densidade de microvasos foi observado entre os grupos citados, sem alteração do ponto de máxima vascularização (Figura 15 A a, b, 15 B a-c, 16 a, 17 a,b, f, g). Com relação ao grupo CH, verificou-se aumento do VEGF epitelial e estromal em relação ao grupo C16 (Figura 15 A b, c, 15 B d, e, f). A análise da quantificação proteica confirmou o aumento de VEGF no grupo CH em relação ao grupo C16 (Figura 16 b). A densidade de microvasos também se mostrou aumentada no grupo CH em relação ao grupo C16, sem alteração no ponto de máxima vascularização (Figura 17 b, c, h, i).

Grupos tratados: Efeito do tratamento com ECJ

O tratamento com o ECJ reduziu o nível proteico de VEGF de forma significativa entre os grupos C16 e JC e numericamente na análise imunohistoquímica (Figura 15 A b, d, B d-f, 16 b). Entretanto, diferença significativa na média da densidade de microvasos ou no ponto de máxima vascularização não foi verificada entre os grupos citados (17 b, d, h, i). Ainda, redução significativa do VEGF total e

estromal, acompanhada pela diminuição da densidade dos microvasos foi verificado no grupo JH em relação ao CH (Figura 15 A c, e, 15 B d-f, 16 b, 17 c, e, h, i).



Figura 15: Imunomarcação para VEGF (setas): A) Fotomicrografias: (a) C8: grupo eutanasiado com 8 semanas de idade; (b) C16: grupo dieta normolipídica; (c) CH: grupo dieta hiperlipídica; (d) JC: grupo dieta padrão jabuticaba; (e) JH: grupo dieta hiperlipídica jabuticaba. B) Quantificação de imunoreatividade total (a,d); epitelial (b,e) e estromal (e,f). Teste t-*Student* (a-c) e Anova seguido de Tukey (d-f) com indicação de diferença estatística: (*): $p \le 0.5$; (**): $p \le 0.01$; (***): $p \le 0.001$, onde: (a) significante \neq C16, (b) significante \neq CH. Contra coloração com hematoxilina.



Figura 16 atualizada: Análise dos níveis proteicos de VEGF. a) C8: grupo eutanasiado com 8 semanas de idade; C16: grupo dieta padrão; CH: grupo dieta hiperlipídica, JC: grupo dieta padrão jabuticaba; JH: grupo dieta hiperlipídica jabuticaba. Teste t-*Student* (a) e Anova seguido de Tukey (b) com indicação de diferença estatística: (*): p \leq 0.5, onde: (a) significante \neq C16, (b) significante \neq CH. Os resultados estão apresentados como porcentagem \pm desvio padrão em relação ao controle endógeno β -actina.



Figura 17: Imunomarcação positiva de CD31. (a) C8: grupo eutanasiado com 8 semanas de idade; (b) C16: grupo dieta padrão; (c) CH: grupo dieta hiperlipídica, (d) JC: grupo dieta padrão jabuticaba; (e) JH: grupo dieta hiperlipídica jabuticaba. (f) Quantificação da média da densidade de microvasos. Teste t-*Student* (f-g) e Anova seguido de Tukey (h-i) com indicação de diferença estatística: (**): $p\leq0.01$; (***): $p\leq0.001$, onde: (a) significante \neq C16, (b) significante \neq CH. Contra coloração com hematoxilina.

5.1.8 Avaliação da DACT1

Grupos controles: Efeito da DH

A técnica de hidridização *in situ* revelou que o gene *DACT1* foi expresso tanto no epitélio quanto no estroma prostáticos dos animais do grupo C16 (Figura 18 a-b). A expressão epitelial se deu no citoplasma das células secretoras. A expressão da *DACT1* se mostrou mais proeminente nas porções acinares de epitélio simples, as quais corresponderam às áreas de epitélio saudável (Figuras 18 a). O perfil estromal, disposto ao redor dos ácinos, também mostrou expressão desse gene com distribuição tanto ao redor dos

ácinos de epitélio saudável como dos ácinos com NIP (Figura 18 a). O grupo CH mostrou distribuição do gene *DACT1* similar ao descrito no grupo C16 (Figura 18 b). No entanto, o compartimento estromal apresentou regiões de expressão mais proeminentes da *DACT1*, acompanhando o aumento estromal descrito na análise morfológica deste grupo (Figura 18 b). Interessante ressaltar que no grupo CH a expressão estromal desse gene se deu em extensas áreas próximas às regiões epiteliais que não expressaram este gene, caracterizadas com proliferação celular (Figura 18 a). Este fato se contrapõe ao observado no do grupo C16, cuja expressão se deu de forma mais uniforme na extensão epitelial do ácino e do estroma ao redor deste (Figura 18 a).

Com relação à análise de RT-PCR, esta mostrou que o consumo da DH aumentou de forma significativa o gene *DACT1* no grupo CH relação ao grupo C16 (Figura 18 f).

A análise dos níveis proteicos da DACT1 não revelou nenhuma alteração significativa entre os grupos experimentais (Figura 19). No entanto, aumento numérico, não significativo desta molécula foi identificado no grupo JC e JH em relação aos seus controles C16 e CH, respectivamente (Figura 19).

Grupos tratados: Efeito do tratamento com ECJ

A análise de hidridação *in situ* mostrou que a expressão do gene *DACT1* ocorreu de forma semelhante entres os grupos C16 e JC (Figura 18 a, c). Com relação ao grupo JH, este mostrou extensas áreas de expressão estromal deste gene, assim como observado no grupo CH (Figura 18 b, d-e). No entanto, o grupo JH mostrou expressão epitelial ressaltada do que as áreas epiteliais do grupo CH (Figura Figura 18 b, d-e).

A quantificação por RT-PCR revelou que tratamento com o ECJ não modificou a expressão de *DACT1 no grupo* JC em comparação ao seu controle C16 (Figura 18 f). No entanto, aumento deste gene foi observado no grupo JH em relação ao seu grupo controle, ou seja, CH (Figura 18 f).



Figura 18: Hibridização *in situ* e RT-PCR de *DACT1*. Fotomicrografias de hibridização *in situ* (a-e) (setas). (a) C16: grupo dieta padrão mostrando distribuição da expressão gênica de *DACT1* tanto no epitélio quanto no estroma (setas finas), bem como no estroma de áreas de NIP (cabeça de seta); (b) CH: grupo dieta hiperlipídica mostrando áreas de proeminente expressão estromal ao redor de epitélio sem expressão de *DACT1* (asteriscos); (c) JC: grupo dieta padrão jabuticaba; (d-e) JH: grupo dieta hiperlipídica jabuticaba. (f) Expressão gênica relativa de *DACT1*. Anova seguido de Tukey com indicação de diferença estatística: (*): p<0,5, onde: (a) significante \neq C, (b) significante \neq CH. O gene *GAPDH* foi utilizado como controle endógeno.



Figura 19: Análise dos níveis proteicos de Dact1. C16: grupo dieta padrão; CH: grupo dieta hiperlipídica; JC: grupo dieta padrão jabuticaba; JH: grupo dieta hiperlipídica jabuticaba. Anova seguido de Tukey. Os resultados estão apresentados como porcentagem \pm desvio padrão em relação ao controle endógeno β -actina.

5.2 Resultados referentes ao tratamento com Berberina

5.2.1 Peso corporal e consumo energético

O consumo da DH aumentou o peso corporal e consumo energético do grupo CH16 em relação ao grupo C16 (Figura 20 a, b). O tratamento com berberina reduziu o peso corporal nos grupos tratados, BC e BH em relação aos seus respectivos controles C16 e CH16. No entanto, o consumo energético não apresentou diferença significativa entre os grupos citados (Figura 20 b).



Figura 20: (a) Ganho de peso corporal (final-inicial). (b) Consumo energético. C16: grupo dieta padrão 16 semanas. BC: grupo dieta padrão berberina. CH16: grupo dieta hiperlipídica 16 semanas. BH: grupo dieta hiperlipídica berberina. Anova seguido de Tukey, com indicação de diferença estatística: (*): $p \le 0.5$ e (***): $p \le 0.001$, onde: (a) significante \neq C16, (b) significante \neq CH16.

5.2.2 Teste de resistência à insulina (ITT)

O grupo CH16 apresentou aumento significativo da resistência à insulina em relação ao grupo C16 (Figura 21 a, b). Diminuição significativa da resistência à insulina foi verificada no grupo BC em

relação ao seu controle C16, porém não houve alteração signicativa entre os grupos CH16 e BH (Figura 21 a, b).



Figura 21: Resultados do teste de resistência à insulina (ITT). (a) Média da área abaixo da curva e desvio padrão do ITT. (b) Média dos níveis de glicose sanguínea nos tempos 0, 10, 15, 30 e 60 minutos após administração intraperitoneal de insulina. C16: grupo dieta padrão 16 semanas. BC: grupo dieta padrão berberina. CH16: grupo dieta hiperlipídica 16 semanas. BH: grupo dieta hiperlipídica berberina. Anova seguido de Tukey, com indicação de diferença estatística: (*): $p\leq0.5$ e (**): $p\leq0.01$, onde: (a) significante \neq C16.

5.2.3 Análise morfológica

Grupos controles: Efeito da DH e progressão tumoral

A avaliação morfológica mostrou que o grupo controle C8 apresentou ácinos prostáticos com pregueamentos pontuais do epitélio em direção ao lúmen. O epitélio é do tipo simples com células colunares e núcleos basais, com cromatina condensada e nucléolo proeminente. No estroma, elementos fibrilares e fibras musculares lisas delgadas foram identificadas, as quais se apresentaram arranjadas ao redor dos ácinos (Figura 22A a, b). Ocasionais áreas de proliferação do tipo NIP de baixo e alto grau e baixa frequência de ABD foram identificadas neste grupo (C8) (Figura 22A a; B b). Com relação aos grupos controles C12, CH12 e C16, estes apresentaram morfologia acinar e estromal semelhante à descrita no grupo C8 (Figura 22A b, c, d, e, f). Entretanto, diminuição de áreas saudáveis e aumento de lesões tipo NIP de alto grau e ABD foram observados no grupo C16 em comparação ao grupo C8 (Figura 22A f; 9B a, c, d). Com relação ao grupo controle, que consumiu a DH (CH16), este apresentou aspectos morfológicos similares aos grupos controles (Figura 22A g, h). Contudo, a frequência relativa do epitélio

saudável e de NIP de baixo grau diminuiu em relação aos demais grupos controles, prevalecendo áreas de lesões de NIP de alto grau e ABD (Figura 22B a, b, c, d).

Grupos tratados: Efeito do tratamento com berberina

A administração da berberina aumentou a frequência de epitélio saudável nos dois grupos tratados (BC e BH) em relação aos seus grupos controles (C16 e CH16, respectivamente) (Figura 22A i, j; 22B a, c). Além disso, diminuição significativa de NIP de alto grau e ABD foi observada no grupo BH em relação ao grupo CH16 (Figura 22B c, d). No entanto, diferenças significativas não foram caracterizadas com relação à NIP de baixo grau, após tratamentos dos grupos BC e BH em relação aos seus respectivos controles, C16 e CH16 Figura 22B b, d).

O controle de toxicidade para o DMSO foi avaliado e não se identificou diferenças no padrão de lesões do camundongo TRAMP com 16 semanas de idade, após a administração (como controle) do DMSO (ver figura 28 em materiais anexos).



Figura 22: (A) Fotomicrografia do LDL da próstata dos diferentes grupos experimentais. (a-b) Grupo C8: epitélio saudável; (c) Grupo C12; (d) Grupo CH12; (e-f) Grupo C16: NIP de baixo grau (seta) e elementos fibrilares (barra); (g-h) grupo CH16: NIP de alto grau (seta) e ABD (asterisco). (i) Grupo BC: áreas de epitélio saudável; (j) Grupo BH: Diminuição de NIP de alto grau e ABD. Hematoxilina-Eosina. Ep: epitélio, St: estroma, L: lúmen, FE: elementos fibrilares. (B) Frequência relativa do estadiamento

das lesões. (a) Epitélio saudável; (b) NIP de baixo grau; (c) NIP de alto grau; (d) ABD. Anova seguido de Tukey, com indicação de diferença estatística: (*): $p\leq0.5$; (**): $p\leq0.01$, (***): $p\leq0.001$, onde (a) significante \neq C8, (b) significante \neq C12, (c) significante \neq CH12, (d) significante \neq C16, (e) significante \neq CH16.

5.2.4 Análise de proliferação celular

A avaliação da imunoreatividade para o PCNA confirmou os resultados obtidos na análise morfológica, demonstrando aumento significativo deste marcador de proliferação no grupo CH16 em comparação aos grupos CH12 e C16 (Figura 23 a, b, c, d, h). Com relação ao tratamento com a berberina, tanto no grupo BC como no BH se caracterizou diminuição de proliferação em relação aos seus controles (C16 e CH16, respectivamente) (Figura 23 f, g, h).



Figura 23: Imunoreatividade de PCNA. (a) Grupo C8; (b) Grupo C12; (c) Grupo CH12; (d) Grupo C16; (e) Grupo CH16; (f) Grupo BC; (g) Grupo BH; (f) Quantificação da imunomarcação de PCNA. Anova seguido de Tukey, com indicação de diferença estatística: (*): $p \le 0.5$ e (***): $p \le 0.001$, onde (c) significante \neq CH12, (d) significante \neq C16, (e) significante \neq CH16. Contra coloração com hematoxilina.

5.2.5 Avaliação da angiogênese

Grupos controles: Efeito da DH e progressão tumoral

A imunomarcação de VEGF não mostrou diferença epitelial, estromal ou total no grupo C16 comparado ao grupo C12 (Figura 24 a, b, c, h, i. j). No entanto, aumento de VEGF epitelial e total foi observado no grupo CH16 em relação ao grupo CH12 e total em relação ao grupo C16 (Figura 24 a, c, e, h, i, j). Com relação à média e ponto de máxima vascularização de microvasos, diferença significativa entre os grupos controles não foi verificada (Figura 25 a, b, c, d, e, h).

Grupos tratados: Efeito do tratamento com berberina

O tratamento com berberina diminuiu o VEGF epitelial, estromal e total em ambos os grupos tratados (BC e BH) em relação aos seus controles (C16 e CH16, respectivamente) (Figura 25 d, e, f. g). Ainda, aumento da média da densidade de microvasos foi verificado entre os grupos CH16 e BH (Figura 25 h). Alteração significativa não foi verificada com relação ao ponto de máxima vascularização (Figura 25 i).



Figura 24: Imunomarcação positiva de VEGF (setas). (a) Grupo C8; (b) Grupo C12; (c) Grupo CH12; (d) Grupo C16; (e) Grupo CH16; (f) Grupo BC; (g) Grupo BH; (h, i ,j). Quantificação total, epitelial e estromal, respectivamente. Anova seguido de Tukey, com indicação de diferença estatística: (*): $p\leq0.5$ e (***): $p\leq0.001$, onde (c) significante \neq CH12, (d) significante \neq C16, (e) significa \neq CH16. Contra coloração com hematoxilina.



Figura 25: Imunomarcação positiva de CD31 (setas). (a) Grupo C8; (b) Grupo C12; (c) Grupo CH12; (d) Grupo C16; (e) Grupo CH16; (f) Grupo BC; (g) Grupo BH; (f) Quantificação da imunomarcação de CD31. Anova seguido de Tukey, com indicação de diferença estatística: (*): $p \le 0,5$ e (***): $p \le 0,001$, onde (a) significa \ne C8, (e) significa \ne CH16. Contra coloração com hematoxilina.

5.2.5 Imunomarcação de TGF_β

Grupos controles: Efeito da DH e progressão tumoral

A análise de imunohistoquímica mostrou aumento de TGF β epitelial no grupo C12 em relação ao grupo C8 e estromal entre os grupos C12 e C16 (Figura 26 a, b, c, d, e, h, i, j). Em adição, o TGF β estromal e total aumentou no grupo CH16 em relação ao grupo CH12 e o TGF β total aumentou em comparação ao grupo C16. (Figura 26 a, c).

Grupos tratados: Efeito do tratamento com berberina

Diminuição de TGFβ epitelial e estromal foi observada no grupo BC em relação ao C16 e de TGFβ epitelial no grupo BH comparado ao grupo CH16 (Figura 26 f, g, h, i ,j).



Figura 26: Imunomarcação positiva de TGF β (setas). (a) Grupo C8; (b) Grupo C12; (c) Grupo CH12; (d) Grupo C16; (e) Grupo CH16; (f) Grupo BC; (g) Grupo BH; (h, i, j) Quantificação total, epitelial e estromal, respectivamente. Anova seguido de Tukey, com indicação de diferença estatística: (*): p \leq 0.5, (**): p \leq 0.01, (***): p \leq 0.001, onde (a) significante \neq C8, (b) significante \neq C12, (c) significante \neq CH12, (d) significante \neq C16, (e) significante \neq CH16. Contra coloração com hematoxilina.

5.2.6 TBARS e atividade enzimática do estresse oxidativo

Grupos controles: Efeito da DH e progressão tumoral

A análise do plasma mostrou diminuição do TBARS e da atividade da GPx no grupo C16 em relação ao grupo C12 (Figura 27 a, b). Também, aumento do TBARS no grupo CH16 foi verificado em comparação ao grupo C16 e diminuição da atividade da GPx entre os grupos citados (Figura 27 a, b). Com relação a atividade da catalase, aumento no grupo CH16 foi identificado em relação aos grupos CH12 e C16 (Figura 27 c). Já a atividade da SOD total aumentou no grupo CH16 em comparação ao grupo C16 (Figura 27 d).

Grupos tratados: Efeito do tratamento com berberina

O tratamento com berberina não promoveu diferença significativa na análise de TBARS entre os grupos BC e BH e seus respectivos grupos controles, C16 e CH16 (Figura 27 a). Com relação a atividade da GPx, verificou-se aumento no grupo BC em comparação ao grupo C16 (Figura 27 b). Já o grupo BH não diferiu do grupo CH16 com relação a atividade da GPx (Figura 27 b). Embora não tenha sido identificada alteração significativa na atividade da catalase com o tratamento dos grupos BC e BH e relação aos seus respectivos controles, C16 e CH16, aumento da atividade da SOD total no grupo BC foi caracterizada (Figura 27 c, d).



Figura 27: Análises plasmáticas de TBARS e atividade enzimática antioxidante. (a) Peroxidação lipídica pelo método de TBARS. (b) atividade da superóxido dismutase total (SOD total). (b) atividade da GPx. (c) atividade da catalase. Anova seguido de Tukey com indicação de diferença estatística: (*): p<0,5; (**): p<0,01, onde: (a) significante \neq C12, (b) significante \neq CH12, (c) significante \neq C16, (d) significante \neq CH16.

6. DISCUSSÃO

6.1 Discussão referente ao tratamento com ECJ

O presente estudo demonstrou que o ECJ atuou nas vias de proliferação, angiogênese e remodelação da MEC, atrasando o desenvolvimento do PCa de modo efetivo no microambiente glandular, particularmente, após a ingestão de DH quando as alterações teciduais se apresentavam intensificadas. Assim, após o tratamento com o ECJ, verificamos diminuição da NIP de baixo e alto grau nos grupos JC e JH, respectivamente. Particularmente no grupo JH, tal diminuição proliferativa foi reiterada pelo marcador de proliferação celular.

De forma geral, nossos resultados mostraram que o sobrepeso no modelo TRAMP aumentou a proliferação das células epiteliais prostáticas, acelerando a progressão do PCa. Concomitante as alterações epiteliais, ocorreram modificações da MEC, caracterizadas pela diminuição da laminina e aumento da MMP9 após o consumo da DH, bem como no grupo C16 em relação ao C8.

A literatura especializada apontou o câncer como uma doença na qual as células adquirem capacidade de se dividir e crescer incontrolavelmente (Hanahan e Weinberg, 2000). Isto posto, autores verificaram que condições obesogênicas *in vitro*, avaliadas através da co-cultura de adipócitos 3T3-L1 e células do PCa, aumentaram a proliferação das células de PCa em relação ao meio de cultivo padrão (Hao *et al.*, 2020). Os mesmos autores mostraram que *in vivo*, também se identificou aumento do crescimento tumoral em modelo xenográfico de PCa, após consumo de DH (Hao *et al.*, 2020).

Outros estudos clínicos evidenciaram que a elevada ingestão de lipídios, aumentou o diagnóstico de PCa em homens a partir de 60 anos de idade (Lophatananon *et al.*, 2010). Segundo Huang e colaboradores, este fato pode estar relacionado a ativação da via MCP-1/CCR2/Akt, a qual está envolvida ao aumento de proliferação e invasão pelas células do PCa (Huang *et al.*, 2012). Segundo, Ribeiro e colaboradores, o consumo da DH levou ao desenvolvimento de atrofia glandular no LV de ratos (Ribeiro *et al.*, 2012). Os mesmos autores ainda observaram alterações como dilatação das cisternas do retículo endoplasmático, maiores quantidades de microvilosidades apicais, além de gotículas lipídicas no epitélio secretor de animais que ingeriram DH, sugerindo que a obesidade interferiu na atividade sintética das células epiteliais e que o acúmulo de gordura dentro delas pode prejudicar sua fisiologia (Ribeiro *et al.*, 2012).

Além disso, a literatura mostrou que o tecido adiposo é uma mistura heterogênea de diversos tipos de células compreendendo células imunes, fibroblastos, população de células-tronco denominada "pré-

adipócitos" e adipócitos maduros, capazes de promover a progressão tumoral em vários tipos de câncer (Nassar *et al.*, 2018). Também, outro estudo indicou que o camundongo TRAMP submetido à DH apresentou aumento sérico de diversas adipocinas e citocinas, sendo essas relacionadas ao aumento de inflamação e deposição de tecido adiposo (Hu *et al.*, 2018). Ainda, considerando a proximidade do tecido adiposo periprostático, estudos indicaram sua influência sobre a progressão do PCa, promovendo um microambiente inflamatório e pró-metastático (Nassar *et al.*, 2018). Também, deve-se considerar que as células tumorais prostáticas estimularam a lipólise do tecido adiposo periprostático com consequente liberação de ácidos graxos, os quais são consumidos preferencialmente pelas células prostáticas cancerígenas em detrimento à glicose, demonstrando a importância do tecido adiposo para a progressão da doença (Liu *et al.*, 2010; Laurent *et al.*, 2019).

Outro estudo em camundongos TRAMP com 6 semanas de idade, que consumiram DH com 45% de banha e foram classificados com *score* para NIP de I a IV nos quatro pares de lobos da próstata, demonstraram que essas lesões foram mais agressivas no LDL dos animais que consumiram DH em relação aos que não consumiram (Chang *et al.*, 2014). Porém, essas alterações só foram observadas nos camundongos eutanasiados com 10 semanas de idade, enquanto que nos camundongos com 5 semanas de idade não foram identificadas diferenças significativas (Chang *et al.*, 2014). Em adição, camundongos TRAMP submetidos a DH, de 5 a 28 semanas de idade, apresentaram aumento da metástase em linfonodos e pulmões, quando comparados aos animais de mesma idade (Hu *et al.*, 2018). Portanto, esses achados corroboram com nossos atuais resultados, onde concluímos que no microambiente prostático do camundongo que consumiu a DH houve aumento de lesões mais severas como a NIP de alto grau e ABD, caracterizando a DH como fator intensificador para o PCa.

Também, os resultados do presente estudo mostraram que concomitante às alterações epiteliais, ocorreu diminuição da laminina e aumento da MMP9, particularmente no grupo CH, além da elevada frequência de ABD neste grupo.

É conhecido que a atividade da MMP9 aumenta a degradação da MEC e está relacionada a estágios mais avançados do PCa (Pego *et al.*, 2018). Também, autores identificaram que o plasma de pacientes com PCa metastático apresentou maiores níveis de MMP2, MMP9 e MMP13 do que o plasma de pacientes com PCa com carcinoma confinado ao órgão (Morgia *et al.*, 2005). Segundo Mandel et al., 2018, a MMP9 parece atuar na sinalização de invasão celular através do estímulo promovido pelo AR, o qual aumenta a expressão de MMP9 em linhagens PC3 e LNCaP (Mandel *et al.*, 2018). Outra evidência do papel da MMP9 na promoção da agressividade do PCa foi demonstrada pelo silenciamento do fator de crescimento derivado de hepatoma nas linhagens LNCaP, DU145 e PC3 (Yang *et al.*, 2018). Este

silenciamento resultou na redução da migração e invasão dessas células e diminuição dos níveis proteicos de MMP2 e MMP9 nas linhagens mencionadas (Yang *et al.*, 2018). Ainda, as imunomarcações de MMP 1, 2 e 9 se mostraram aumentadas em amostras prostáticas de pacientes com PCa, quando comparadas a amostras de pacientes com hiperplasia benigna da próstata (Zhong *et al.*, 2008). Ainda, tais alterações da MEC também foram evidenciadas em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, quando se identificou diminuição da laminina, além de outros marcadores da lâmina basal na próstata de camundongos TRAMP, conforme a progressão do PCa nas idades de 8, 12 e 16 semanas, bem como aumento da MMP9 no TRAMP com 22 semanas em relação ao de 16 semanas de idade (Nogueira Pangrazi *et al.*, 2018; Da Silva *et al.*, 2020).

Estudos *in vitro* demonstraram que a clivagem da laminina promove a migração de células LNCaP e a diminuição da adesão das células DU145, demonstrando que este pode ser um dos mecanismos que promovem progressão e metástase do PCa (Bair *et al.*, 2005; Tripathi *et al.*, 2008). Em adição, as análises de amostras da próstata humana mostraram que as biópsias de PCa mostraram menor detecção proteica das cadeias β 3 e γ 2 da laminina 5 em relação às amostras saudáveis (Hao *et al.*, 2001).

Diante do exposto, os resultados do presente estudo reiteram o conhecimento de que durante a progressão do PCa, o estroma adjacente ao tumor sofre alterações que levam ao crescimento aberrante e à transformação morfológica do estroma glandular ao redor do tumor, gerando um microambiente favorável ao avanço da doença bem como indicam o desequilíbrio da interação epitélio-estroma.

Além disso, Vaicik e colaboradores analisaram camundongos com deficiência de laminina-α4, alimentados ou não com DH (45% de lipídio), reportando ganho de peso mais lento nesses animais, sem alteração da ingestão de alimento (Vaicik *et al.*, 2014). Tal fato demonstrou que componentes específicos da MEC tem grande influência sobre a fisiologia do tecido adiposo, visto que a deficiência da laminina foi capaz de alterar vias relacionadas ao ganho de peso (Vaicik *et al.*, 2014). Ainda, Silva e colaboradores observaram aumento de 43% da imunoreatividade de MMP2 e três vezes mais da MMP9 no LV de ratos obesos, o que foi confirmado pela análise da atividade enzimática dessas moléculas, demonstrando que o consumo da DH causa mudanças estromais que propiciam a progressão do PCa (Silva *et al.*, 2015). Isto posto, destacamos que esses resultados foram coincidentes aos verificados em nosso presente estudo.

Também, a partir da literatura sabe-se que durante a progressão do câncer, pode ocorrer ativação de células tumorais pelos adipócitos, os quais produzem adipocinas e lipídios para as células cancerígenas,

recrutando células imunológicas que se infiltram no carcinoma promovendo crescimento tumoral e aumento do metabolismo lipídico celular (Lengyel *et al.*, 2018).

Na literatura, diferentes estudos têm validado os efeitos antiproliferativo e pró-apoptótico dos polifenóis sobre o PCa tanto in vitro como in vivo (Kampa et al., 2000; Ferruelo et al., 2014; Gui-Zhi et al., 2015). Lamas e colaboradores demonstraram que dentre os constituintes do ECJ (extrato da casca de jabuticaba) estão os flavonóides como quercetina e epicatequina e os ácidos fenólicos, tais quais o ácido gálico e ácido elágico (Lamas et al., 2018). Outros autores demonstraram que a apigenina, um polifenol da classe dos flavonóides, quando administrada entre as idades de 8 a 28 semanas de idade, inibiu a progressão do PCa através de sua ação inibitória sob a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) -Akt no LDL de camundongos TRAMP e pela redução do nível de ciclina D1 em células PC3 e LNCaP (Shukla et al., 2014; Costea et al., 2019). Além disso, os compostos fenólicos apresentaram efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos em linhagens celulares de PCa, através da redução da atividade do NF-Kβ, o qual é um importante fator envolvido na via de proliferação por meio do AKT (mediador de fator de crescimento) (Lall et al., 2015; Zhou et al., 2016). Em adição, Leite-Legatti e colaboradores realizaram ensaios de IC50 para avaliar o extrato de jabuticaba liofilizado e dissolvido em metanol em linhagens de câncer de cólon, ovário, pulmão, mama, glioma, entre outros (Leite-Legatti et al., 2012). Tais autores reportaram que tal extrato apresentou efeitos antiproliferativos e contra o crescimento celular in vitro, sobretudo nas linhagens de PCa (PC3) e leucemia (K-562) (Leite-Legatti et al., 2012).

Outros estudos demonstraram que polifenóis, como a curcumina, inibiram a adesão de células PC3 expostas a MCP1, um quimioatrativo de monócitos, alterando moléculas estruturais como laminina, colágeno e fibronectina (Herman *et al.*, 2009). Ainda, flavonóides, como as antocianinas, promoveram diminuição da invasão e metástase tumoral de células do câncer de pulmão, sugerindo essa como efeito decorrente da diminuição da atividade de MMPs (Chen *et al.*, 2006).

Isto posto, a partir dos nossos atuais resultados concluímos que o consumo da DH em fases iniciais do desenvolvimento do PCa no modelo TRAMP, favorece o microambiente neoplásico, permitindo a progressão do adenocarcinoma de forma mais rápida e agressiva, através de vias de sinalização envolvendo importantes moléculas da matriz extracelular. Além disso, o ECJ apresentou efeito protetor em relação às lesões mais severas, preferencialmente, após o consumo da DH, considerando o papel definitivo de moléculas estruturais na remodelação tecidual.

Ainda, a partir dos atuais resultados concluímos que o ECJ foi efetivo em preservar e colaborar para a manutenção da integridade estrutural da próstata, através da molécula de laminina, contribuindo para

o atraso da progressão tumoral. Essa efetividade foi evidente no tecido prostático apresentando maior severidade de deficiência de laminina, provavelmente devido ao aumento de NIP de alto grau e ABD no grupo JH. Ainda, sugerimos que o efeito protetor do ECJ relacionado à laminina pode ser associado à diminuição de moléculas como a MMP9 e consequente diminuição do ABD. Dessa forma, o ECJ contribuiu para a interação epitélio e estroma prostático, efeito crucial para a dinâmica funcional desse órgão.

Também, no presente estudo aumento da imunoreatividade de TGFβ foi observado entre os grupos C8 e C16 tanto no compartimento estromal como no epitelial do LDL do modelo TRAMP, o que foi confirmado pela quantificação proteica.

A literatura especializada evidenciou que um dos importantes reguladores da expressão de MMP9 é o TGFβ, o qual atua através da via TGFβ/SMAD/MMP9 (Cao e Kyprianou, 2015). O TGFβ é um fator de crescimento que em condições normais da próstata atua diminuindo proliferação e aumentando apoptose (Jones *et al.*, 2009). Desse modo, nos estágios iniciais do PCa, o TGFβ age na diminuição do crescimento celular (Jones *et al.*, 2009). No entanto, em estágios avançados, este fator está associado ao aumento da angiogênese, proliferação e crescimento tumoral prostático (Chen *et al.*, 2005). Interessante observar que a imunomarcação de TGFβ1 é maior em amostras tumorais de hiplerplasia benigna do que em amostras de PCa, sendo que na hiplerplasia, esse fator apresenta ação antiproliferativa, através da inibição da via IL6/STAT3 (Starsíchová *et al.*, 2010; Afdal *et al.*, 2019).

Com relação aos estudos clínicos, vem sendo demonstrado baixa expressão gênica de TGF β em pacientes com PCa inicial de acordo com a escala de *Gleason*, enquanto que a mesma se encontra aumentada em pacientes com grau acima de 7 desta escala, o que sugeriu que a super expressão desse fator está relacionada agressividade do tumor (Reis *et al.*, 2011).

Isto posto, sugerimos que o aumento do TGFβ observado em nosso estudo pode estar relacionado a influência do TGFβ na fase pró-proliferativa, em resposta ao aumento do ABD entre os grupos C8 e C16.

No presente estudo, alteração do nível proteico de TGFβ após a ingestão da DH não foi observada. Sabe-se que o TGFβ está aumentado em indivíduos com obesidade classe III em comparação a indivíduos saudáveis (Pereira *et al.*, 2014). Em ratos que consumiram DH, aumento do mRNA do TGFβ foi verificado no tecido adiposo epididimal e retroperitoneal (Sousa-Pinto *et al.*, 2016). No entanto, a fosforilação da SMAD3, uma proteína importante em sua via de sinalização, se mostrou semelhante aos animais controles (Sousa-Pinto *et al.*, 2016). Em contrapartida, no câncer de mama, a DH aumentou o TGF β , o qual ativou a SMAD3, promovendo remodelação estromal pró-tumorigênica através da diferenciação de miofibroblastos (Duan *et al.*, 2018). Na próstata, o TGF β pode promover metástase através da ativação da via miR-301a/AR/TGF- β 1/Smad/MMP9, deflagrada por pré-adipócitos, mostrando que a remodelação da MEC pode ser uma das vias pela qual a obesidade influencia a progressão do PCa (Xie *et al.*, 2015).

Em nossos resultados, a não alteração do TGF β após o consumo da DH parece não ter influenciado o aumento de proliferação, angiogênese e remodelação estromal, que caracterizamos nas análises de morfologia e a quantificação proteica da laminina, MMP9 e VEGF. No entanto, a literatura demonstrou que a próstata é responsiva as adipocinas liberadas do tecido adiposo periprostático (Uehara *et al.*, 2018). O TGF β é uma das proteínas produzidas pelos adipócitos que atua como importante mediador na progressão do PCa (Ribeiro *et al.*, 2006). Assim, a não alteração do TGF β pode ser decorrente da agressividade presente na progressão tumoral em que o grupo CH se encontra e um aprofundamento desse estudo seria necessário para o entendimento da via do TGF β , levando em consideração a sua produção pelo tecido adiposo e sua influência no metabolismo prostático.

Com relação ao tratamento com o ECJ, o presente estudo mostrou que este foi capaz de diminuir a quantificação proteica de TGF β tanto nos grupos JC como no JH. A literatura já evidenciou a ação de regulação da via do TGF β no câncer por polifenóis (Hong-Sheng *et al.*, 2015). Chen e colaboradores administraram o flavonóide ácido elágico em células de câncer de mama e demonstraram que 16 genes da via TGF β /SMAD foram regulados resultando na interrupção do ciclo celular e inibição da proliferação (Hong-Sheng *et al.*, 2015).

Também, Gray e colaboradores trataram a linhagem de fibroblasto de próstata WPMY com TGF β e observaram aumento da produção de α -actina, colágeno e proliferação celular (Gray *et al.*, 2014). Em seguida, os autores trataram essas células na presença ou não do TGF β com os polifenóis epigalocatequina-3-galato e luteolina, demonstrando que após o tratamento houve redução do nível proteico de TGF β e da proliferação celular, bem como da deposição da MEC (Gray *et al.*, 2014). Esses achados demonstram que os polifenóis apresentam a capacidade de regular negativamente o TGF β na próstata e reduzir a remodelação estrutural que esta via proporciona (Gray *et al.*, 2014). Dessa forma, nossos presentes resultados comprovaram que o ECJ foi capaz de diminuir o TGF β tanto no compartimento estromal como epitelial e reduzir a remodelação da MEC, colaborando na preservação da integridade estrutural da próstata.

No presente estudo, proteínas importantes para o equilíbrio oxidativo celular, bem como suas atividades plasmáticas foram avaliadas. Nossos resultados mostraram que no período de progressão inicial, o TRAMP apresentou diminuição da quantidade proteica de catalase e aumento da SOD2 na próstata entre os grupos C8 e C16. Além disso, os níveis proteicos do 4HNE, um dos principais produtos da peroxidação lipídica, sendo que alteração entre os grupos C8 e C16 não foi detectada para esta molécula.

A literatura demonstrou que células cancerígenas aumentam a produção de EROS devido ao aumento da glicólise e fermentação do ácido latíco como forma de adaptação às condições de hipóxia (Kumari *et al.*, 2018). Nesse contexto, sabe-se que a atividade da SOD2 produz peróxido de hidrogênio, que é uma EROS capaz de causar danos ao DNA, contribuindo para o desenvolvimento do câncer (Khan *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2019). Já a catalase converte o peróxido de hidrogênio produzido pela SOD2 em água e oxigênio que são produtos não tóxicos (Rahman *et al.*, 2019). Portanto, a diminuição da catalase tem sido relacionada a microambientes favoráveis ao dano do DNA como ocorre no câncer de mama (Khan *et al.*, 2010).

A maior parte dos estudos sobre as enzimas antioxidantes envolvendo amostras prostáticas focam na quantificação da atividade dessas moléculas e não em sua quantificação proteica tecidual (Arsova-Sarafinovska *et al.*, 2009). No entanto, Oberley e colaboradores analisaram a imunomarcação de SOD2 e catalase em biópias de próstata provenientes de pacientes com PCa metastático (Oberley *et al.*, 2000). Tais autores verificaram que a imunomarcação da SOD2 ocorreu tanto nos ácinos saudáveis como nos adenocarcinomas, sendo que nesse último foi observado aumento da imunoreatividade nas áreas de invasão (Oberley *et al.*, 2000). Já a catalase se encontrou distribuída moderadamente no citoplasma das células basais e menos nas células secretoras dos ácinos saudáveis, enquanto que no adenocarcinoma sua marcação foi vestigial (Oberley *et al.*, 2000).

Aydin e colaboradores avaliaram as atividades plasmáticas da catalase e da SOD em amostras de próstata provenientes de pacientes saudáveis, com hiperplasia benigna ou com PCa, sem considerar o grau de Gleason, não observando diferenças na atividade da catalase (Aydin *et al.*, 2006). Porém, a SOD1 diminuiu e a peroxidação lipídica aumentou no grupo com PCa em relação aos demais grupos (Aydin *et al.*, 2006).

Baker e colaboradores também analisaram amostras de biópsias prostáticas de pacientes com PCa e revelaram que as células epiteliais malignas apresentaram menor imunoreatividade da catalase, SOD1 e SOD2 do que as células do epitélio benigno do mesmo paciente (Baker *et al.*, 1997). Os autores

sugeriram que no adenocarcinoma existe diminuição da capacidade de resposta a produção de EROS devido aos baixos níveis de antioxidantes presentes (Baker *et al.*, 1997). Os autores não identificaram correlação entre a imunomarcação dessas enzimas com a escala de Gleason (Baker *et al.*, 1997).

Arsova-Sarafinovska e colaboradores analisaram biópsias de próstata provenientes de pacientes da Macedônia e da Turquia e classificaram as amostras em grupo de hiperplasia benigna, câncer de baixo risco e câncer de alto risco (Arsova-Sarafinovska *et al.*, 2009). Tais autores verificaram que a atividade da catalase estava diminuída apenas nas biópsias de PCa de baixo risco em relação a hiperplasia benigna (Arsova-Sarafinovska *et al.*, 2009). Em adição, aumento da peroxidação lipídica foi observado tanto no grupo de PCa de baixo risco, quanto de alto risco em relação ao grupo de hiperplasia benigna (Arsova-Sarafinovska *et al.*, 2009).

Com relação ao 4HNE, este é um dos mais estudados produtos da peroxidação lipídica e é considerado fator relevante para a carcinogênese, devido à sua capacidade de se ligar covalentemente ao DNA (Gasparovic *et al.*, 2017). Em adição, o 4HNE também pode ser citotóxico para as próprias células cancerígenas (Gasparovic *et al.*, 2017). Dessa forma, o 4HNE tem sido relacionado a danos do DNA e está aumentado em doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como síndromes metabólicas, doenças cardiovasculares e câncer (Singhal *et al.*, 2015). Em contrapartida, a análise de imunoreatividade do 4HNE, em amostras prostáticas de pacientes com PCa, mostrou que este esteve presente moderadamente no citoplasma das células em ácinos saudáveis com uma marcação granular, enquanto no adenocarcioma a imunomarcação foi vestigial, sem o padrão granular (Oberley *et al.*, 2000). A literatura demonstrou que a resposta celular para o 4HNE diferiu entre células normais, onde desempenham ação prócrescimento, comparadas às células cancerígenas onde em altas concentrações é citotóxica (Gasparovic *et al.*, 2017). Estudos evidenciaram que a ação do 4HNE pode promover efeito antiproliferativo e próapotótico nas linhagens celulares LNCaP, PC3 e DU145 de PCa, através da via de sinalização da p53 (Pettazzoni *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2014), e promover a saída de EROS da mitocrôndria provocando danos ao DNA e levando ao início do câncer (Zhong e Yin, 2015).

Desse modo, a não alteração dos níveis de 4HNE entre os grupos C8 e C16 pode sugerir que a via da peroxidação lipídica ainda não está tão ativa nesta fase inicial do desenvolvimento do PCa.

Ainda, o presente resultado demonstrou a tendência de aumento do 4HNE no grupo JC, que pode se relacionar com a fase antiproliferativa desta molécula, visto que diminuição de NIP de baixo grau foi identificada neste grupo. Já o aumento do 4HNE no grupo CH e redução após tratamento, indicou que o

ECJ pode ter influenciado a não superprodução do 4HNE devido ao consumo da DH, contribuindo para o balanço oxidativo no microambiente prostático.

Em adição, destacamos que a maior parte dos estudos envolvendo atividade antioxidante em PCa se dá por avaliações *in vitro* e em humanos, portanto, a avaliação desta via em modelo animal transgênico, considerando a progressão do PCa em TRAMP ainda não foi totalmente estabelecida.

Os resultados do presente estudo sobre os efeitos da ingestão da DH em camundongos TRAMP, mostraram aumento das proteínas antioxidantes catalase, SOD2 e GR, bem como o 4HNE no grupo CH. Os presentes resultados corroboram com os achados prévios do nosso grupo de pesquisa, que observou aumento da catalase, SOD2 e 4HNE na próstata de camundongos FVB senis que consumiram DH com 20% de teor lipídico (Lamas *et al.*, 2020).

Estudos tem indicado que dentre os fatores que estimulam o estresse oxidativo, destacam-se a obesidade, sobrepeso e a síndrome metabólica, sendo esses fatores de risco para o desenvolvimento de câncer, relacionando-os ao aumento de adipocinas como leptina, adiponectina, IL-6 e VEGF (Rani *et al.*, 2016).

A literatura especializada não é clara nem tão pouco extensa com relação à expressão antioxidante no modelo de PCa, considerando a progressão desse tipo de câncer. No entanto, sabe-se que uma vez que células tumorais prostáticas invadem o tecido adiposo periprostático, ocorre estimulação desse último e consequente aumento de EROS (Laurent et al., 2019). No modelo TRAMP, estudos demonstraram diminuição da expressão de mRNA, bem como da imunohistoquímica de GPx3 no LDL de animais submetidos a DH, contendo 45% de banha a partir das 6 semanas de idade até 10 semanas de idade (Chang et al., 2014). Os autores também demonstraram que nos animais não transgênicos, a GPx3 estava altamente expressa (Chang et al., 2014). Com relação ao 4HNE, este é um fator de crescimento bifásico, sendo estimulante do crescimento celular em baixas doses e citotóxica em altas doses (Gasparovic et al., 2017). Portanto, o resultado das atividades biológicas do 4HNE varia dependendo da origem das células cancerígenas e da fase da carcinogênese (Gasparovic et al., 2017). Assim, o 4HNE, pode tanto contribuir para o crescimento do tumor como com a morte de células cancerígenas (Gasparovic et al., 2017). Em vários tipos de tumores, a progressão da malignidade é acompanhada por reduções do estresse oxidativo, devido à regulação positiva da capacidade antioxidante (Barrera et al., 2015). Por outro lado, apesar da redução do estresse oxidativo intrínseco, o nível da proteína HNE nas células cancerígenas pode aumentar, devido à resposta inflamatória presente nos tecidos com lesões de câncer circundantes (Barrera et al., 2015).

Ainda, como as células cancerígenas têm elevada geração de EROS e estão sob aumento do estresse oxidativo intrínseco, é hipotizado que essas células malignas sejam mais dependentes de antioxidantes para a sobrevivência celular e, portanto, mais vulneráveis a danos oxidativos adicionais induzidos por agentes geradores (Trachootham *et al.*, 2009).

Isto posto, a partir dos resultados atuais e a literatura especializada, evidenciamos que os danos causados pela DH estimulam as vias relacionadas ao equilíbrio oxidativo. Assim, o presente estudo demonstrou que o consumo da DH levou ao aumento das enzimas antioxidantes e da GR no microambiente prostático com elevada frequência de adenocarcinoma. Assim, este fato pode ser decorrente da tentativa de diminuição do estresse oxidativo, que também é nocivo ás células cancerígenas. Do mesmo modo, o aumento de 4HNE também reflete uma resposta ao aumento de EROS teciduais.

Também, os presentes resultados mostraram que o tratamento com o ECJ foi capaz de diminuir a catalase, GR, SOD2 e 4HNE no grupo JH. Já no grupo JC, a catalase aumentou em relação ao seu controle C16 e a GR apresentou-se diminuída nesse mesmo grupo.

Estudo prévio do nosso grupo de pesquisa já havia evidenciado o efeito do ECJ nas dosagens de 2,9 g/Kg e 5,8 g/Kg em camundongos FVB senis, indicando que as duas dosagens de tratamento diminuíram a catalase, a SOD2 e o 4HNE no LV desses animais (Lamas *et al.*, 2020).

Alezandro e colaboradores administraram 1,0g/kg ou 2,0g/kg de pó de jabuticaba diluída em água durante 40 dias em ratos diabéticos e analisaram a capacidade antioxidante e peroxidação lipídica em diversos tecidos (Alezandro *et al.*, 2013). Os mesmos autores não verificaram diferenças nos rins e no fígado (Alezandro *et al.*, 2013). Já aumento da catalase foi verificada no cérebro de forma dose dependente e aumento tanto da catalase quanto da GPx no fígado com a segunda dose (Alezandro *et al.*, 2013).

Outros pesquisadores analisaram os efeitos de 1%, 2% e 4% de jabuticaba liofilizada adicionada a ração de ratos, verificando que todas as porcentagens aumentaram a atividade de GPx e da SOD no fígado (Batista *et al.*, 2014). Tais resultados indicaram que a ação dos antioxidantes é variável entre os tecidos, bem como a dose da jabuticaba administrada, ressaltando que a via de ação terapêutica da jabuticaba não está ainda bem elucidada (Alezandro *et al.*, 2013).

Com relação à próstata, o estudos com linhagens celulares e modelos *in vivo* do PCa mostraram que os polifenóis foram capazes tanto de aumentar enzimas antioxidantes como também atuaram na indução

de EROS, de acordo com o tipo de célula analisada (Costea *et al.*, 2019). Em ratos Sprague-Dawley, a suplementação do flavonóide quercetina resultou no aumento da atividade enzimática de SOD, catalase, GPx e GR no LV e LDL. Tais resultados foram relacionados à regulação das vias de apoptose, proliferação e crescimento celular, melhorando o quadro de PCa (Sharmila *et al.*, 2014).

Também, deve-se ressaltar que os polifenóis podem desempenhar papéis antioxidantes e próoxidantes, sendo que o efeito antioxidante reduz o desequilíbrio induzido pelo estresse oxidativo e o próoxidante induz citotoxicidade em células cancerígenas (Costea *et al.*, 2019).

Isto posto, concluímos que o ECJ interferiu na via de sinalização do estresse oxidativo, favorecendo a estabilidade tecidual da próstata com diferentes ações entre os grupos JC e JH. Sendo que, o tratamento do grupo JC preveniu a diminuição da catalase, enquanto que no grupo JH levou a manutenção dos níveis das enzimas antioxidantes, indicando equilíbrio mesmo na presença da DH.

Com relação a atividade enzimática da SOD total e catalase, bem como a peroxidação lipídica no plasma dos animais do modelo TRAMP, identificamos a redução da atividade da catalase, aumento da SOD total e diminuição da peroxidação lipídica na fase inicial de progressão do PCa.

A literatura tem mostrado divergências nos estudos relacionando PCa e as atividades enzimáticas de antioxidantes, como a catalase e a SOD (Battisti *et al.*, 2011).

Ahmed e colaboradores demonstraram que o plasma de pacientes com PCa, com idade entre 45-70 anos, apresentaram menor atividade das enzimas catalase e SOD e aumento de peroxidação lipídica em relação às amostras saudáveis (Ahmed Amar *et al.*, 2019). No entanto, o estudo não mencionou o estágio de progressão do PCa nesses pacientes (Ahmed *et al.*, 2019). Aliseydi e colaboradores demonstraram que amostras plasmáticas de pacientes com PCa, também apresentaram menor atividade da catalase, capacidade antioxidante total e aumento de peroxidação lipídica em relação a amostras de pacientes com hiperplasia benigna (Aliseydi *et al.*, 2019).

Já, Shulka e colaboradores avaliaram o plasma de indivíduos saudáveis comparados a indivíduos que apresentavam NIP de alto grau sem a presença de PCa (Shukla *et al.*, 2020). Os autores não observaram diferenças nos níveis da atividade da catalase, SOD total e peroxidação lipídica entre os dois grupos (Shukla *et al.*, 2020).

Por outro lado, Battisti e colaboradores verificaram diminuição da atividade da catalase plasmática em pacientes com PCa com grau maior que 7 na escala de Gleason em relação a pacientes saudáveis (Battisti *et al.*, 2011). Já os pacientes que apresentaram PCa com grau menor que 7, não diferiram do

grupo controle com relação a catalase, enquanto que a atividade da SOD total permaneceu inalterada em todas as comparações (Battisti *et al.*, 2011).

Em adição, Jung e colaboradores compararam linhagens celulares provenientes de tecido prostático cancerígeno e não cancerígeno, demonstrando que a atividade da catalase, SOD, GR e GPx não alteraram quando comparadas (Jung *et al.*, 1997). Em contrapartida, os mesmos pesquisadores reportaram aumento da atividade da catalase e diminuição da atividade da SOD na linhagem de PCa/LNCaP (andrógeno responsiva) em relação a linhagem PCa/PC3 (linhagem andrógeno não responsiva) (Jung *et al.*, 1997).

A literatura especializada reportou que alguns antioxidantes podem perder sua referida atividade e até mesmo atuar de forma pró-oxidante quando em níveis altos (Young and Lowe, 2001). Em relação às EROS, estas podem favorecer o desenvolvimento do câncer, provocando alterações mutagênicas no DNA e ativando vias de proliferação através da proteína kinase AMP-ativada (AMPK) (Gill *et al.*, 2016). Por outro lado, células cancerígenas também são sensíveis ao estresse oxidativo provocado pelas EROS, sendo que tais moléculas podem levar a apoptose de células cancerígenas, indicando que as enzimas antioxidantes podem ter efeito paradoxal durante o desenvolvimento e progressão do câncer (Gill *et al.*, 2016).

De modo geral, os estudos da literatura aqui apresentados demonstraram que no plasma de pacientes com PCa ocorreu aumento da peroxidação lipídica associada a diminuição ou não alteração de enzimas antioxidantes, como SOD e catalase (Battisti *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2019; Aliseydi *et al.*, 2019).

Isto posto, os nossos resultados mostraram que em nível sistêmico, ocorreu aumento de enzimas antioxidantes e diminuição de peroxidação lipídica na fase inicial da progressão do PCa no camundongo TRAMP. Esses dados demonstram que o desequilíbrio oxidativo prostático é um fator inicial no desenvolvimento do PCa, podendo ser detectado a nível sistêmico. De acordo com a literatura aqui presente e com base em nossas análises no presente estudo, hipotizamos que estes resultados podem estar relacionados a tentativa de conter o estresse oxidativo e geração de EROS, decorrentes do tumor local. No entanto, dado as escassas conclusões baseadas na progressão do PCa, mais estudos devem ser realizados na tentativa de caracterizar papel dessas enzimas nas diferentes fases de progressão do câncer de próstata.

Com relação ao efeito do consumo da DH, os resultados do presente estudo indicaram que essa dieta foi capaz de aumentar a atividade plasmática da SOD total e da catalase, porém alterações significativas da peroxidação lipídica não foram identificadas.

Também, outros autores verificaram que ratos Wistar submetidos a DH, contendo 59.8 kcal% de gordura durante 8 semanas, a partir da quinta semana de vida, apresentaram aumento da atividade enzimática plasmática da catalase, GPx e SOD1, além de aumento plasmático na quantidade de 4HNE e da peroxidação lipídica (Maciejczyk *et al.*, 2018).

Lasker e colaboradores estudaram ratos Wistar com 12 semanas de idade que consumiram DH com 49% de teor de gordura durante 8 semanas, os quais mostraram aumento plasmático da peroxidação lipídica e diminuição da atividade da catalase e da SOD no plasma (Lasker *et al.*, 2019). Com base nesses dados, os autores descreveram que esses resultados refletiram que o equilíbrio oxidativo sistêmico está comprometido devido á baixa das enzimas antioxidantes (Lasker *et al.*, 2019). Batista e colaboradores verificaram que 31% de banha na ração consumida por ratos *Sprague–Dawley*, durante 10 semanas, não alterou a atividade enzimática da catalase bem como da GR no plasma (Batista *et al.*, 2014).

Diante do exposto, concluímos que o aumento da atividade da SOD total e da catalase no plasma dos animais que consumiram DH, indica que essa dieta pode ter aumentado a produção de EROS, causando aumento compensatório da atividade de enzimas antioxidantes em nível sistêmico no camundongo TRAMP. Este fato pode ser levado em consideração em estudos futuros, objetivando a caracterização de biomarcadores das diferentes fases da progressão do PCa.

O presente resultado também revelou que a administração do ECJ diminuiu a atividade da SOD total tanto no grupo JC como no JH. Ainda, aumento da catalase foi observado no grupo JC, além de redução no grupo JH.

De acordo com a literatura, o tratamento com 1,0g/kg ou 2,0g/kg de pó de jabuticaba diluída em água durante 40 dias em ratos diabéticos diminuiu a peroxidação lipídica, catalase e GPx no plasma desses animais apenas com a segunda dose (Alezandro *et al.*, 2013). Já a administração de 1%, 2% ou 4% de jabuticaba liofilizada adicionada a ração de ratos, mostrou que a jabuticaba, nas porcentagens de 2% e 4%, aumentou a atividade da catalase plasmática (Batista *et al.*, 2014).

Nossos resultados mostraram que a administração do ECJ possivelmente preveniu o aumento da produção de EROS, sistemicamente, nos animais que consumiram DH, reduzindo o aumento da atividade das enzimas antioxidantes catalase e SOD no grupo JH. Já a redução da atividade da SOD, concomitante ao aumento da atividade da catalase no grupo JC, sugere melhora na produção e eliminação de H₂O₂, o que pode ser crucial para a o equilíbrio oxidativo na fase inicial de progressão tumoral. Dessa forma, o tratamento com ECJ contribuiu para o equilíbrio oxidativo sistêmico no camundongo TRAMP, demonstrando potencial para o tratamento de pacientes com sobrepeso e PCa.

Com relação à angiogênese, os resultados do presente estudo mostraram que no início da progressão do PCa, ocorreu aumento da média da densidade de microvasos e dos níveis proteicos de VEGF entre os grupos C8 e C16. No entanto, alteração dos pontos de máxima vascularização entre os grupos citados não foi verificada.

Sabe-se que a angiogênese é um dos principais processos na progressão do câncer, tendo o VEGF como um dos fatores de crescimento envolvidos no desencadeamento da angiogênese tumoral (Melegh and Oltean, 2019). O VEGF é uma glicoproteína produzida tanto por células tumorais como estromais prostáticas, que estimula a proliferação e migração de células endoteliais (Goel e Mercurio, 2013).

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa verificou-se que o VEGF e CD31 não apresentaram diferença significativa na média da densidade de microvasos tanto no LDL como no LV em camundongos TRAMP com idades de 8 e 16 semanas (Da Silva *et al.*, 2017; Nogueira Pangrazi *et al.*, 2018) No entanto, tendência de aumento tanto de VEGF como da densidade de microvasos foi identificada com relação às idades de 8 e 12 semanas e entre 16 e 22 semanas no LV (Da Silva *et al.*, 2017). Por outro lado, Yang e colaboradores observaram aumento de VEGF, concomitante com o aumento de vasos sanguíneos, conforme o avanço do tumor na escala de *Gleason* (Yang *et al.*, 2006). Já Montico e colaboradores observaram intensa imunoreatividade de VEGF tanto no epitélio como no estroma do LDL de TRAMP com 8 ou 18 semanas de idade, sendo que essa imunoreatividade foi maior no estroma dos camundongos TRAMP mais velhos (Montico, Kido, Hetzl, *et al.*, 2015). No entanto, os dados de quantificação proteica não apontaram diferença estatística significativa de VEGF no LDL, entre os camundongos TRAMP com 8 e 18 semanas de idade (Montico *et al.*, 2015).

Também, deve-se considerar que durante a progressão do PCa existe um processo denominado *switch* angiogênico, que se caracteriza inicialmente pelo aumento de fator indutor de hipóxia 1 (HIF1) e sinalizações de receptores de VEGF (como o VEGFR2), concomitante com a diminuição de VEGFR1, conforme as NIPs se desenvolvem (Huss *et al.*, 2001). Segundo autores, neste momento apenas níveis de mRNA de VEGF são detectáveis, porém quando o PCa está com nível de agressividade maior ocorre aumento do HIF1, estimulando o aumento dos níveis proteicos de VEGF e resultando na formação de microvasos no tecido prostático (Huss *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 2012).

Park e colaboradores submeteram camundongos BALB/c, por 4 semanas de idade a DH, sendo que 16 semanas após a ingestão da dieta foram inoculadas células de câncer de cólon, com posterior coleta de amostras com 31 dias após a inoculação. Os resultados revelaram que os animais que consumiram DH apresentaram maior imunoreatividade para CD31 e VEGF nas amostras tumorais, além da análise

de quantificação proteica, confirmando o aumento de VEGFR2 e HIF1 e indicando aumento da angiogênese nesses animais (Park *et al.*, 2012).

Isto posto, a partir dos presentes resultados concluímos que houve aumento da angiogênese no LDL do camundongo TRAMP na fase inicial da progressão do PCa, sem correlação direta pontual com as NIPs, devido a não diferença nos pontos de máxima vascularização.

Ainda, nos presentes resultados verificamos aumento da imunomarcação de VEGF e do CD31 no quadro de sobrepeso proporcionado pelo consumo da DH.

Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa verificou que no LV de camundongos FVB senis que consumiram DH com 21% de gordura, houve aumento da imunomarcação de VEGF e CD31, quando comparados aos da dieta padrão (Lamas *et al.*, 2020).

Em adição, é conhecido que o VEGF é considerado uma adipocina e seus altos níveis séricos estão associados ao sobrepeso (Makey *et al.*, 2013). Com relação ao câncer, sabe-se que o consumo da DH aumentou a angiogênese e facilitou o crescimento tumoral de células do câncer de cólon e de mama, sendo que neste último, o VEGF desempenhou importante papel na progressão tumoral em camundongos obesos pela via de ação IKK β /mTOR/VEGF (Chen *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012). Em adição, estudos mostraram que condições obesogênicas causadas pelo consumo da DH por camundongos C57BL/ inoculados com tumor de mama ER positivo, estimularam a angiogênese tumoral de mama, aumentando a microvasculatura em 40% (Dong *et al.*, 2017).

Portanto, a partir do aumento dos marcadores de angiogênese após o consumo da DH observados no presente estudo, concluímos que no PCa no modelo TRAMP, a angiogênese foi uma das vias moduladas se considerando o quadro de sobrepeso, contribuindo para o aumento da progressão dessa doença em seu estágio inicial.

Ainda, os resultados do presente estudo indicaram que o ECJ foi efetivo na diminuição de marcadores da angiogênese no grupo JH, além da redução de VEGF no grupo JC.

Na literatura especializada tem-se estudado a ação de polifenóis na diminuição do VEGF, apesar de haver poucos relatos sobre essa ação em modelos de PCa (Adhami *et al.*, 2004; He *et al.*, 2016; Costea *et al.*, 2019). Nesses estudos, o consumo de chá verde por 24 semanas reduziu o VEGF no lobo dorsolateral de camundongos TRAMP, os quais iniciaram o consumo na idade de 8 semanas (Adhami et al. 2004). Ainda, o ácido gálico apresentou efeito inibitório da produção de VEGF e de HIF1α em linhagens de células do câncer de ovário, além de inibir a formação de novos tubos em células HUVECs

(He et al 2015). Os flavonóides fazem parte da composição do ECJ e estes compostos apresentaram efeitos antiangiogênicos como inibição da expressão de VEGF e da migração de células endoteliais em estudo *in vitro*, além da redução da densidade de microvasos em ratos (Li *et al.*, 2012).

Em adição, nosso grupo de pesquisa observou que o ECJ diminuiu CD31 e VEGF de forma dose dependente, no LV de camundongos FVB senis submetidos ou não ao consumo da DH (Lamas *et al.*, 2020).

Assim, concluímos que a ação antiangiogênica do ECJ, sobretudo no quadro de sobrepeso, contribuiu para a redução da severidade do PCa. Embora a diminuição do VEGF tenha sido identificada no grupo JC, destacamos que a diminuição do VEGF foi pronunciada no grupo que consumiu a DH, sugerindo que a ação do ECJ foi marcadamente eficaz no tecido com acentuada desorganização biológica, como foi o caso do grupo DH. No entanto, mais estudos são necessários para estabelecer como ação dos polifenóis, ou seja, vias de ativação para a modulação da angiogênese.

Nosso estudo é o primeiro a avaliar a expressão da *DACT1* em modelo de PCa, bem como a relacionar a expressão de tal gene em animais com PCa que consumiram DH. Os presentes resultados demonstraram que a expressão gênica da *DACT1* aumentou com o consumo da DH e ainda mais após o tratamento com o ECJ. Apesar de não haver diferença estatística para a quantificação proteica, observamos a mesma tendência da expressão gênica.

A família Dact também denominada Dapper (Dpr) ou Frodo, é composta pelos genes *DACT1*, *DACT2* e *DACT3* que codificam proteínas intracelulares capazes de regular vias intercelulares (Kivimäe *et al.*, 2011). Dessa forma, tais proteínas apresentam um terminal de ligação responsável por se ligar a um dos componentes da via Wnt denominado Dvl (Saijun Mo and Cui, 2012). Assim, atuam como antagonistas da via Wnt/ β -catenina, pois ao se ligarem a esses componentes, impedem a ligação da Wnt aos seus receptores, impedindo a progressão dessa via (Saijun Mo and Cui, 2012). Isto posto, estudos sugeriram que as proteínas Dact podem influenciar a via Wnt/ β -catenina em tecidos cancerígenos, onde seus níveis ou localização subcelular estão desregulados por meio de mutação ou mecanismos epigenéticos (Kivimäe *et al.*, 2011).

Diversos estudos têm abordado a relação da expressão gênica e da hipermetilação das *DACT* nos diferentes tipos de câncer, tais quais escamoso oral, nasofaríngeo e cólon (Yuan *et al.*, 2012; Schussel *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2019). Yuan e colaboradores avaliaram amostras de carcinoma de cólon humanas e verificaram super expressão do gene *DACT1* e aumento de sua proteína resultante nessas amostras (Yuan *et al.*, 2012). Esses achados foram associados aos processos de proliferação, migração e falta de ancoragem das células do carcinoma de cólon, sendo que também foi observado em outro
estudo *in vitro*, após a indução do aumento da expressão da *DACT1* (Yuan *et al.*, 2012). Por outro lado, Schussel e colaboradores investigaram a expressão gênica da *DACT1* em amostras de carcinoma escamoso oral humanas e não observaram alterações epigenética na expressão e hipermetilação da *DACT1*, apesar da literatura demonstrar que a via Wnt/ β -catenina está associada a progressão desse tipo de câncer (Schussel *et al.*, 2015). Contudo, a *DACT1* está relacionada a supressão tumoral em linhagens celulares de câncer do ovário do tipo I, no câncer de mama e nasofaríngeo, demonstrando que o papel deste gene difere a depender do tipo de câncer (Yin *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2019).

Wang e colaboradores, objetivando elucidar a regulação transcricional da *DACT1*, utilizaram a linhagem de células intestinais normais IEC-6, por serem responsivas ao fator de crescimento TGF β , e verificaram que a expressão desse gene regulou positivamente a expressão do gene *DACT1* (Wang *et al.*, 2018).

Estudos tem evidenciado que a via Wnt- β -catenina também está relacionada a inibição da adipogênese em seus estágios iniciais (Christodoulides *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2010). Em adição, o aumento da atividade da Wnt no tecido adiposo de pacientes obesos pode aumentar a resistência à insulina de adipócitos já maduros ao mesmo tempo que impede a adipogênese de células mesenquimais precursoras (Laudes, 2011). Lagathu e colaboradores mostraram que a *DACT1* é um gene expresso na fase de pré-adipócito, mas que está diminuído durante a adipogênese *in vitro*, indicando que esse gene é responsivo a alterações no tecido adiposo (Lagathu *et al.*, 2009). Ainda, os autores analisaram camundongos da linhagem com obesidade genética (*ob/ob*) com 5 semanas de idade, os quais mostraram níveis elevados do gene *DACT1* no tecido adiposo em comparação com os animais de 16 semanas, os quais se equiparam com a fase de obesidade e diabetes estabelecida (Lagathu *et al.*, 2009).

Isto posto, os presentes resultados caracterizaram pela primeira vez que o gene *DACT1* é responsivo ao consumo da DH no modelo TRAMP, indicando uma via de interesse para o entendimento dos efeitos do sobrepeso no PCa. Ainda, inferimos que o aumento da *DACT1* observado no grupo CH pode estar relacionado a responsividade desse gene a fase metabólica de formação de pré-adipocitos que pode estar ocorrendo neste grupo. No entanto, mais estudos dessa via são necessários, consideração o modelo de PCa e o estágio nutricional em conjunto.

Em adição, os flavonóides são uma classe de compostos bioativos que promovem diversos efeitos biológicos, dentre os quais, o de supressão da via Wnt/ β -catenina, inibindo por consequência o crescimento de células de PCa (Tarapore *et al.*, 2012). Rahman e colaboradores demonstraram que a antocianina, delfinidina, que também está presente no extrato de jabuticaba, apresentou efeitos anti-

obesogênicos através da inibição da diferenciação da linhagem de pré-adipócito 3T3-L1 (Rahman *et al.*, 2016). Interessante ressaltar que os autores sugeriram que essa inibição se deve pela regulação positiva da via Wnt-β-catenina (Rahman *et al.*, 2016).

Outros resultados do presente estudo, por meio de outras técnicas de biologia celular, demonstraram que o consumo da DH acelerou a progressão do PCa no modelo TRAMP, o que foi reduzido após do tratamento com o ECJ. Portanto, considerando esses dados em conjunto, sugerimos efeitos positivos dos polifenóis na via Wnt/ β -catenina ao observamos o aumento epigenético da *DACT1*, a qual é antagonista da via mencionada. Esse achado indica que esse estudo epigenético pode ser uma importante abordagem para futuros estudos, a fim de promover a compreensão da importância dessa via para o paciente com PCa e sobrepeso ou obesidade.

Portanto, os presentes resultados demonstraram que a *DACT1* é responsiva ao microambiente tumoral prostático, com indício de supressor tumoral, bem como ao tratamento com compostos naturais. Interessante ressaltar que, a expressão da *DACT1* se deu tanto em células benignas como malignas da próstata, o que sugere que este gene pode ter diferentes ações durante a progressão do PCa e é uma potencial via no entendimento da complexidade do PCa.

De forma geral, visto que o tratamento não apresentou efeitos significativos e/ou mais pronunciado na maior parte dos parâmetros analisados entre os grupos C16 e JC, nossos resultados indicam que este tratamento pode ser mais efetivo em microambientes com maior agressividade da neoplasia sob influência do tecido adiposo no quadro de sobrepeso.

Finalizando, concluímos que o tratamento com o ECJ promoveu efeitos benéficos contrapondo-se ao estresse oxidativo e protegendo a integridade da MEC. Ainda, o ECJ apresentou ação antiangiogênica e anti-proliferativa no modelo de PCa. Esses efeitos foram exacerbados no ambiente glandular sob influência dos efeitos deletérios da DH.

Ainda, ECJ desempenha importante papel na remodelação tecidual e em sinalizações proliferativas agravadas pelo sobrepeso associado ao PCa, se mostrando potente protetor natural no PCa, associado a desordens metabólicas provenientes do sobrepeso, indicando uma opção futura para pacientes com sobrepeso e PCa.

6.2 Discussão referente ao tratamento com berberina

A administração da berberina foi capaz de prevenir o ganho de peso causado pelo consumo da DH e de reduzir esse parâmetro mesmo no grupo BC, o qual consumiu a dieta normolipídica. No entanto, a diminuição do ganho de peso corporal observada não indicou relação direta à ingestão calórica.

A literatura especializada mostrou que Choi e colaboradores realizaram tratamento com berberina durante 4 semanas, administrando 5 ou 10 mg/kg de berberina diluída em DMSO duas vezes por semana, via intraperitoneal, em camundongos machos BALB/c de 6 semanas de idade, xenográficos para PCa (Choi *et al.*, 2009). Tais autores, não observaram alteração do peso desses animais após os tratamentos com ambas as doses mencionadas acima (Choi *et al.*, 2009). Em outro estudo, Zhang e colaboradores administraram 6 doses, com intervalo de dois dias entre essas, de 5 ou 10 mg/kg de berberina via intraperitoneal em camundongos BALB/c, xenográficos para PCa (Zhang *et al.*, 2014). Zhang e colaboradores não verificaram diferença no peso desses animais após o tratamento com berberina (Zhang *et al.*, 2014). (Ver tabela 3- material complementar listando dados de pesquisas, focando no PCa e tratamento com berberina e a não alteração do peso dos grupos experimentais).

Em outro estudo, camundongos fêmeas, xenográficas para câncer de intestino, foram tratadas intraperitonealmente com berberina, com as doses de 5, 10 ou 20 mg/kg a cada dois dias, durante 14 dias (Zhang *et al.*, 2020). Os autores reportaram que os animais submetidos a dose de 5 mg/kg não apresentaram alteração de peso comparado ao grupo controle, sendo que os grupos tratados com 10 e 20 mg/kg mostraram leve diminuição de peso (Zhang *et al.*, 2020).

Não obstante a dosagem e forma de administração da berberina serem próximos aos trabalhos citados com PCa, ressaltamos que todos os modelos apresentados são xenográficos e não transgênicos tal qual o presente estudo (ver tabela 3 em materiais anexos complementares). Nessa cinscunstância, o modelo xenográfico possibilita o estudo das células cancerígenas *in vivo*, contudo não permite de forma fisiológica global a completa identificação da resposta funcional da interação do câncer com o hospedeiro em relação às respostas biológicas deste último (Jeet *et al.*, 2010).

Dessa forma, como vem sendo demonstrado há décadas, o modelo TRAMP apresenta estágios neoplásicos que permitem o estudo da progressão do PCa, levando-se em consideração interações fisiológicas, o que estabelece vantagem em relação ao modelo xenográfico (Gingrich *et al.*, 1996; Kido *et al.*, 2019).

Outra condição a ser ressaltada é que, o tempo e intervalo de administração da berberina foi o mesmo do estudo de Choi e colaboradores (Choi *et al.*, 2009). No entanto, deve-se considerar que no modelo xenográfico, a maioria das linhagens de células tumorais representam a histologia e os padrões metastáticos de tumores humanos em estágio avançado (Jeet *et al.*, 2010). No caso dos tumores xenográficos com as linhagens LNCaP e PC3, as quais foram utilizadas nos estudos citados da tabela 3, ambas as linhagens originam adenocarcinomas, mesmo com características diferentes, onde a linhagem PC3 progride de forma mais avançada e independente de andrógenos (Tai *et al.*, 2011). Este quadro se contrapõe ao presente estudo que avalia o efeito da berberina no estágio inicial da doença, onde ocorre o desenvolvimento neoplásico e início da progressão do adenocarcinoma.

Ressaltamos que nos estudos citados e evidenciados na tabela 3, os autores não quantificaram o ganho de peso, mas compararam o peso final dos animais tratados ao dos animais controles. Assim, diferencialmente das pesquisas com berberina e PCa xenográficos, o presente estudo, mostrou que o tratamento com berberina foi capaz de prevenir a redução do ganho de peso no modelo transgênico de PCa, que permitiu investigar esse achado na fase inicial de progressão. Este dado se mostrou independente da ingestão calórica, o que abre caminho para a investigação da atuação deste composto bioativo em vias metabólicas lipídicas e glicolíticas no quadro de PCa.

Por outro lado, outros estudos demonstraram que a berberina foi capaz de proporcionar redução do ganho de peso em quadros de consumo de DH e obesidade em ratos obesos que consumiram 100 mg/kg ou 200 mg/kg de berberina via oral, durante 8 semanas, através da diminuição da diversidade de microbiota intestinal e melhora da saúde gastrointestinal (Zhang *et al.*, 2015). Ainda, vale destacar que esse estudo não verificou alterações na ingestão calórica por esses animais, mesmo sendo a via de administração oral, de modo similar ao que observamos em nossos resultados (Zhang *et al.*, 2015). Ainda, Leng e colaboradores administraram 187,5 mg/kg ou 562,5 mg/kg de berberina por 4 semanas, via intragástrica, verificando diminuição do peso corporal e da ingestão de alimentos em ratos machos *Wistar* com tolerância a glicose e que consumiram dieta HF (Leng *et al.*, 2004).

Outros estudos demonstraram redução do ganho do peso em roedores que consumiram DH, após administração de 3 mg/kg de berberina por 36 dias, via intraperitoneal acompanhada da redução de ingestão calórica (Hu e Davies, 2010). Em outra abordagem, a berberina foi administrada via oral na dose de 100 mg/kg por 18 semanas em ratos Wistar, mostrando a redução de peso desses animais tanto no grupo tratado que consumiu DH como o grupo tratado que consumiu dieta normolipídica (Zhang *et al.*, 2012). Interessante ressaltar que, neste estudo os animais tratados que consumiram DH mostraram

peso semelhante ao dos animais não tratados que consumiram dieta normolipídica, semelhante ao que observamos no presente estudo com o modelo TRAMP (Zhang et al. 2012).

Ainda, a literatura evidenciou que no paciente com PCa, o ganho de peso corpóreo juntamente com hiperinsulinemia, podem promover aumento de IGF e IL-6 (Allott *et al.*, 2013). Essas moléculas, por sua vez, estão envolvidas com aumento da proliferação celular e processos inflamatórios, respectivamente, culminando no aumento da agressividade do PCa e na alta mortalidade desses pacientes (Allott *et al.*, 2013).

A via de ação da berberina sobre o ganho de peso ainda é discutida. No entanto, estudos apontaram que os animais que receberam berberina não perderam peso, mas foram protegidos contra o ganho de peso após a intervenção com este tratamento (Xiong *et al.*, 2020). A redução do ganho de peso pelo tratamento com berberina foi frequentemente acompanhada pela diminuição de ingestão de alimento na literatura, por isso estudos investigaram a ação deste tratamento sob o hormônio da saciedade, a leptina (Choi, B. H. *et al.*, 2009). Curiosamente, em estudo *in vitro* com a linhagem 3T3 de adipócitos, os autores verificaram que a berberina reduziu o mRNA de diversas adipocinas relacionadas com a adipogênese, porém a berberina não mostrou efeito algum em moléculas chaves na via de sinalização da leptina como STAT3 e ERK (Choi et al. 2009).

No entanto, estudos apontaram que a berberina tem ação na redução da gliconeogênese hepática e aumento da absorção celular de glicose, levando à melhora do quadro de obesidade (Ilyas *et al.*, 2020). Ainda, na dosagem de 380 mg/kg, a berberina aumentou os genes AMPK e UCP3 no tecido adiposo de ratas, sendo que tais genes estão relacionados ao controle do gasto de energia (Hu *et al.*, 2014).

Os estudos que investigaram a ação da berberina sob roedores que consumiram DH estão pontuados na tabela 4 (materiais anexos complementares). Curiosamente, a ação da berberina sob este parâmetro pareceu não depender da forma de administração deste composto, isto é, se por via oral ou não (ver tabela 4). Interessante ressaltar que, não foi encontrado, até o momento, estudo que abordasse essas variáveis junto ao quadro de câncer como nosso estudo o fez. Ainda, como a tabela 4 pontua, nosso estudo evidenciou redução do ganho de peso nos animais TRAMP com dosagem e tempo de tratamento relevantemente menor à dos estudos listados.

Diante do exposto, nosso presente estudo mostrou que a berberina foi capaz de prevenir o ganho de peso causado pelo consumo da DH com dosagem e tempo de administração inferior à empregada na literatura, fazendo com que os animais que consumiram DH, mantivessem o ganho de peso semelhante

ao observado no grupo que consumiu dieta normolipídica. Isso sugere que a berberina pode ser eficaz no controle do peso de pacientes com PCa com quadro de sobrepeso ou obesidade.

Nossos resultados também demonstraram que a berberina reduziu a resistência à insulina, significativamente, no grupo BC em relação ao grupo C16, porém não foi observada alteração significativa entre os grupos BH e CH16.

Albane e colaboradores estudaram através do soro de 300 homens com idade entre 50 a 69 anos e os acompanharam após 5-12 anos após a coleta do material (Albanes *et al.*, 2009). Os autores reportaram que cerca de 185 pacientes desenvolveram PCa em no mínimo 5 anos após a coleta do soro, e essa incidência se relacionou estatisticamente com alta concentração de insulina no soro, mostrando que a resistência à insulina pode aumentar o risco de desenvolvimento de PCa (Albanes *et al.*, 2009).

Com relação a ação da berberina sobre o metabolismo da glicose e da insulina, estudos demonstraram que este alcalóide estimulou a secreção de insulina tanto *in vitro* como *in vivo* de forma dose-dependente e promoveu a translocação do GLUT4, levando a absorção de glicose na condição de resistência à insulina (Liu, L. Z. *et al.*, 2010). Em outro estudo, doses de 500 mg de berberina foram administradas três vezes por dia, durante três meses em pacientes com diabetes do tipo 2, resultando na redução da resistência à insulina e diminuição da glicose no sangue (Memon *et al.*, 2018). Ainda, 400, 200 e 100 mg/kg de berberina administradas via intragástrica diminuiu a resistência à insulina em ratas com síndrome do ovário policístico, de forma dose dependente (Zhang *et al.*, 2020).

Interessante ressaltar que, estudos indicaram que a ação da berberina sob a regulação da glicose em células cancerígenas diferiu das células normais (Mao *et al.*, 2018). Para entender este mecanismo, Mao e colaboradores reportaram que em estudo *in vitro*, o tratamento com berberina, empregado em duas linhagens diferentes de células de câncer de cólon, promoveu redução da absorção de glicose e regulou negativamente genes envolvidos com o metabolismo da glicose, tais quais GLUT1 e LDHA (Mao *et al.*, 2018).

Diante do exposto, nossos resultados corroboram a literatura mostrando a melhora da via da insulina após tratamento com a berberina e indicando efeitos benéficos ao organismo do camundongo TRAMP com PCa. Este quadro foi significativo no grupo BC, apontando que o tratamento, do ponto de vista dessa análise, foi mais efetivo nos animais sem sobrepeso e com neoplasias prostáticas menos severas. Assim, inferimos que a ação protetora da via da insulina pode estar relacionada ao efeito antitumoral.

Com relação a ação da berberina na via da insulina em roedores que consumiram DH, Liu e colaboradores investigaram o efeito de 200 mg/kg de berberina, durante 8 semanas, em ratos que consumiram DH, durante 28 semanas (Liu *et al.*, 2018). Tais autores verificaram que após o tratamento, o peso corpóreo desses animais não alterou significativamente, no entanto, ocorreu melhora do perfil lipídico, redução da resistência à insulina, diminuição de esteatose e inflamação no fígado, redução de áreas atrofiadas e com perda da borda em escova do epitélio intestinal (Liu *et al.*, 2018). Ainda, a melhora observada no intestino foi associada à modulação da microbiota intestinal, onde foi verificado aumento da população bacteriana de *Lactobacillus* e diminuição de *Escherichia coli* e *Enterococcus* (Liu *et al.*, 2018).

Em outro estudo, camundongos da linhagem C57BL/6 foram submetidos ao consumo de DH e tratados com 75 mg/kg/d ou 150 mg/kg/d de berberina por via oral durante 4 semanas (Wang *et al.*, 2018). Os autores reportaram que a redução da resistência à insulina foi de forma dose dependente (Wang *et al.*, 2018). Apesar de não termos detectado diferença significativa na redução da resistência à insulina no grupo BH, podemos inferir que a dosagem utilizada pode ter influenciado este resultado, considerando que no estudo de Wang a ação da berberina neste parâmetro foi dose dependente. (Wang *et al.*, 2018). Ainda, ressaltamos que as dosagens de tratamento com berberina usadas nos estudos com roedores é evidentemente superior à do presente estudo (ver tabela 4 em material suplementar).

Assim, concluímos que a berberina atuou de forma efetiva na redução da resistência à insulina em camundongos transgênicos para PCa, indicando de maneira inédita a atuação desse fármaco na estabilidade fisiológica em animais com PCa. Além disso, é fato que a berberina também colaborou para a minimização da progressão do PCa nesses animais, indicando novos caminhos para fármacos que podem contribuir no atraso da progressão do PCa. Em adição, demonstramos que no modelo TRAMP, a berberina não atuou na melhora significativa da via da insulina nos animais que consumiram DH. Tal fato nos faz sugerir que o ambiente de alteração metabólica lipídica de sobrepeso pode requerer uma dosagem mais agressiva para a melhora desse parâmetro no modelo TRAMP.

Com relação à histopatologia do LDL da próstata, reiteramos que nossos resultados demonstraram a efetividade da progressão do PCa no modelo TRAMP, através da diminuição de áreas saudáveis, particularmente entre os grupos C16 e C12.

Ainda, o consumo da DH intensificou a severidade da progressão do PCa, visto que as NIPs de baixo grau diminuíram e as de alto grau, bem como o ABD, aumentaram nesse grupo. Nesse contexto, o tratamento com berberina reduziu a frequência de lesões prostáticas com maior agressividade tanto no grupo que consumiu dieta normolipídica, como no que consumiu DH, sendo que tais resultados foram confirmados por marcador de proliferação celular.

De acordo com a literatura, a ação antiproliferativa da berberina já foi descrita anteriormente em diversas linhagens celulares de câncer como o de próstata, pulmão e mama (Choi *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015; Youn *et al.*, 2018). Nosso resultado de redução de imunohistoquímica de PCNA corrobora com o estudo de Choi e colaboradores, onde foi demonstrado que a berberina diminuiu este marcador nos modelos xenográficos para LNCaP e PC3, com a mesma dosagem e tempo de administração usada no presente estudo (Choi *et al.*, 2009). Os autores citados ainda demonstraram que a berberina diminuiu proliferação celular *in vitro*, de forma dose e tempo dependente, tanto da linhagem PC3 como LNCaP (Choi *et al.*, 2009). Interessante ressaltar que, o referido estudo ainda mostrou que a berberina não diminuiu a proliferação de células epiteliais prostáticas não neoplásicas (Choi *et al.*, 2009).

Ainda, Tian e colaboradores estudaram a ação da berberina sobre a linhagem de PCa 22RV1, com e sem adição do hormônio androstenediona, um precursor dos hormônios androgênicos mais potentes (Tian *et al.*, 2016). Tais autores observaram redução da proliferação celular em ambas as condições (com e sem androstenediona) de forma dose dependente (Tian *et al.*, 2016).

Com relação a outros tipos de câncer, Weina e colaboradores demonstraram que a berberina reduziu a proliferação e migração de células de câncer de mama, diminuindo a expressão de MMP2, MMP9 e VEGFR2 (Ma *et al.*, 2017). Ainda, células de câncer de mama da linhagem MCF-7 foram tratadas com 25µM de berberina em 48h e 72h, sendo observado aumento da apoptose através do aumento do citocromo C e caspase-9 e diminuição dos níveis de Bcl-2 (Patil *et al.*, 2010). Ainda, Li e colaboradores investigaram o mecanismo de ação da berberina, através da metabolômica em camundongos nude xenográficos para PCa, verificando que o tratamento diminuiu os níveis de PSA, AR, Bcl-2, COX-2 e aumentou os níveis de caspase-3 e apoptose nas amostras tumorais (Li *et al.*, 2011).

Além do aumento das caspases 3 e 9, evidenciado nos estudos mencionados (Patil *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011), a berberina é descrita como indutora de apoptose através do aumento de EROS, concomitante a ativação do gene de supressão tumoral p53 em linhagens de câncer de mama (Jabbarzadeh *et al.*, 2014). Os efeitos de aumento da apoptose pelo tratamento com berberina, também foram demonstrados por Meeran e colaboradores (Meeran *et al.*, 2008). Tais autores desenvolveram estudo *in vitro* administrando berberina em células de PCa humano e relataram que a apoptose está relacionada ao aumento de EROS no tratamento com berberina (Meeran *et al.*, 2008).

Outro estudo *in vitro* mostrou que a berberina diminuiu proliferação e migração de células de câncer coloretal de forma dose dependente (Mao *et al.*, 2018). Segundo Liu e colaboradores, a administração da beberina em linhagem celular de câncer de cólon inibiu a proliferação dessas células através da interrupção do ciclo celular na fase G0/G1 (Liu *et al.*, 2020). Os mesmos autores indicaram que a inibição proliferativa está relacionada à supressão da síntese lipídica, a qual está relacionada com a proliferação celular através da via Wnt/β-catenina (Liu *et al.*, 2020).

Ainda, estudos com a berberina evidenciaram que sua ação inibitória sobre a migração e invasão de células cancerígenas se deu pela preservação estrutural de células epiteliais, como por exemplo através do aumento da E-caderina em células cancerígenas de pulmão (Liu, D. *et al.*, 2019). Outros estudos demonstraram que a beberina diminuiu MMP9 de forma dose dependente em células de hepatocarcinoma (Sengupta *et al.*, 2017). Também outros autores verificaram que o mecanismo de ação da berberina pode estar relacionado parcialmente com a diminuição da metaderina, uma proteína de membrana celular das células epiteliais que se encontra altamente expressa em células cancerígenas de vários tipos de câncer, como mama e o de próstata (Wan *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2019).

Isto posto, o presente estudo demonstrou a ação antiproliferativa da berberina pela primeira vez em modelo transgênico para adenocarcinoma de próstata e que este fato se relaciona diretamente com a preservação de áreas saudáveis, comprovando que o tratamento com a berberina é capaz de atrasar a progressão do PCa. Ainda, o tratamento levou a diminuição significativa das lesões mais severas no grupo CH16, indicando que a berberina foi capaz de atuar na via de proliferação, também em condições de maior severidade de lesões do microambiente prostático.

Com relação a angiogênese, nossos resultados demonstraram tendência numérica de aumento do VEGF estromal e epitelial conforme a progressão do PCa no grupo C16, o que foi significativamente acentuado no grupo CH16. A densidade de microvasos apresentou somente aumento numérico, não sendo estatisticamente significativo nos diferentes grupos controles de câncer. Apesar disso, o tratamento com a berberina foi capaz de reduzir o VEGF estromal e epitelial nos animais que consumiram ou não a DH, além de também reduzir a densidade de microvasos neste último.

Segundo Huss e colaboradores, o aumento da imunoreatividade de CD31 e do nível proteico de VEGF no modelo TRAMP está relacionado ao aumento de adenocarcinoma bem-diferenciado (Huss *et al.*, 2001). É conhecido que o aumento de VEGF leva ao aumento da permeabilidade de vasos pré-existentes e sinaliza para a chegada de células endoteliais migratórias (Bergers and Benjamin, 2003). Também, estudos com o modelo TRAMP demonstraram que durante o desenvolvimento de NIP, ocorreu aumento

da imunomarcação de CD31 próximo das neoplasias (Huss *et al.*, 2001). Assim, próximo às NIPs de baixo grau a vascularização foi majoritariamente interglandular, enquanto que com o desenvolvimento das NIPs de alto grau e ABD, essa vascularização aumentou e se concentrou próxima às lesões (Huss *et al.*, 2001). Em adição, estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que no modelo TRAMP, tanto o LDL como o LV apresentaram aumento numérico, mas não significativo, da imunoreatividade de CD31 quando comparadas as idades de 8 e 12 semanas de idade (Da Silva *et al.*, 2017; Nogueira Pangrazi *et al.*, 2018).

Também, outros autores avaliaram os efeitos antiangiogênicos da berberina, previamente, *in vitro*, mostrando inibição da formação de vasos sanguíneos (Jin *et al.*, 2018). A ação antiangiogênica da berberina tem sido relacionada à redução da atividade do HIF1 α , que resultou na diminuição do VEGF em nível transcricional (Wang *et al.*, 2020). Hamsa e colaboradores demonstraram esse efeito em estudo *in vivo*, onde administraram 10 mg de berberina/kg em camundongo C57/BL6 com melanoma (Hamsa and Kuttan, 2012). Tais autores observaram que além da redução de HIF1 α e VEGF mRNA, houve diminuição de fatores pró-inflamatórios como IL6, IL1 β e TNF α (Hamsa e Kuttan, 2012).

Em adição, Jin e colaboradores verificaram diminuição do mRNA de CD31 e da fosforilação de VEGFR2 após a administração de 50 mg/kg de berberina em camundongos xenográficos para glioblastoma (Jin *et al.*, 2018). Também, com relação ao PCa, a berberina diminuiu o VEGF e fator indutor de hipóxia (HIF1 α) tanto *in vitro*, nas linhagens LNCaP e DU145, como *in vivo* em modelo LNCaP xenográfico de forma dose dependente (5 mg/kg e 10 mg/kg de berberina administrada intraperitonealmente) (Zhang *et al.*, 2014).

Ainda, em estudo com camundongo xenográfico para câncer de cervical BALB/c nude, a administração oral de berberina (20 mg/kg) durante 21 dias foi capaz de reduzir VEGF e CD31 bem como o crescimento tumoral (Chu *et al.*, 2014). Neste mesmo estudo, camundongos que receberam as células cancerígenas, pela veia caudal, apresentaram diminuição da metástase no pulmão, indicando o potencial terapêutico da berberina em casos metastáticos (Chu *et al.*, 2014).

Considerando a literatura especializada apresentada, os resultados do presente estudo corroboram a ação antiangiogênica da berberina pela via do VEGF. Além disso, a atuação da berberina se deu no momento inicial de desenvolvimento das neoplasias. Isso demonstra que a berberina tem potencial para ser utilizada em pacientes com estágio inicial da progressão da angiogênese durante o PCa, a qual é crucial para o crescimento do tumor. Em adição, demonstramos que a redução do VEGF no quadro de sobrepeso foi efetiva na redução de CD31, o que mostra que a berberina atuou de forma marcante no

momento de maior progressão tumoral em decorrência da ingestão da DH, do ponto de vista da angiogênese.

Ainda, ressaltamos, no quadro de sobrepeso, a berberina demonstrou potencial terapêutico para pacientes de PCa que apresentem síndromes metabólicas, indicando a abrangência dessa terapia dando abertura para futuras explorações nesse viés.

Com relação ao TGFβ, os resultados demonstraram aumento dessa molécula no compartimento epitelial do grupo C12 em relação ao C8, bem como aumento estromal nos grupos C16 e CH16 em relação aos grupos C12 e CH12, respectivamente.

Bhowmick e colaboradores modificaram um camundongo geneticamente para apresentar inativação do receptor de TGF β II em fibroblastos da próstata de camundongo (Bhowmick *et al.*, 2004). Como resultados, ao atingirem 7 semanas de idade, esses camundongos apresentaram menor nível proteico de TGF β e 6 vezes mais imunoreatividade de Ki67 em fibroblastos e epitélio prostáticos, demonstrando que a sinalização do TGF β exerce influência no aumento da proliferação epitelial prostática (Bhowmick *et al.*, 2004).

Por outro lado, Ao e colaboradores realizaram um ensaio de cicatrização de feridas *in vitro*, onde inativaram o TGF β em fibroblastos prostáticos associados a carcinoma e fibroblastos de próstata saudável (Ao *et al.*, 2007). Dessa forma, os autores observaram que os fibroblastos associados ao carcinoma demonstraram menor taxa de cicatrização do que os fibroblastos de tecido saudável (Ao *et al.*, 2007). Ainda, os mesmos autores reportaram que os fibroblastos prostáticos associados ao carcinoma sintetizam mais TGF β do que os fibroblastos de tecido saudável, mostrando que a via do TGF β influencia o estroma prostático de forma diferente durante a carcinogênese (Ao *et al.*, 2007).

Interessante ressaltar que, nossos dados demonstraram aumento estromal do TGF β na mesma fase que observamos aumento de VEGF e aumento de proliferação epitelial (grupo CH16 comparado ao grupo CH12). Portanto, no presente estudo, o TGF β estromal aumentou conforme a progressão das neoplasias prostáticas, acompanhando as sinalizações angiogênicas do microambiente estromal.

Com relação ao tratamento com berberina, este promoveu diminuição do TGF β epitelial e estromal no grupo BC e estromal no grupo BH em relação aos seus controles C16 e CH16, respectivamente.

Um dos estudos pioneiros na descrição imunohistoquímica do TGF β de amostras de próstata humana saudável mostrou que nesta condição, a imunoreatividade de TGF β é negativa ou fraca tanto no compartimento epitelial como estromal (Eastham *et al.*, 1995). Já no caso das amostras de PCa primário,

os mesmos autores mostraram que a imunomarcação estromal de TGF β foi acentuada em 29 amostras de 34 analisadas, enquanto que no compartimento epitelial, a imunomarcação foi pronunciada em 13 amostras de 34 (Eastham *et al.*, 1995). Interessante ressaltar que, os autores ainda reportaram que a imunomarcação epitelial do TGF β aumentou em amostras de PCa provenientes de pacientes com quadro de metástase, sendo identificada a perda da sinalização estromal, o que indicou que a sinalização proteica do TGF β se dá inicialmente no estroma e depois passa a ser epitelial, considerando a fase de progressão do PCa (Eastham *et al.*, 1995).

Dessa forma, a ação da berberina na redução do TGF β epitelial e estromal no início da progressão do PCa é um fator que deve ser considerado para o uso da berberina no tratamento do PCa. No entanto, mesmo reduzindo significativamente apenas o TGF β estromal no grupo BH, pode-se considerar a importância da redução nesse compartimento que tem fundamental participação e/ou atividade no início da progressão tumoral. Esses dados se confirmam pela análise do TGF β estromal do presente estudo, onde foi mostrado que esta molécula diminui no grupo CH16, o qual apresentou processo de progressão mais avançada em relação ao grupo C16.

A diminuição proteica de TGF β após tratamento com berberina já foi descrita em modelo de camundongo com pancreatite crônica (Bansod *et al.*, 2020). Nesse estudo, os autores demonstraram que tanto o nível proteico de TGF β como o das Smads 2 e 3 (proteínas mediadoras da via de sinalização do TGF β) aumentaram no pâncreas desses animais e reduziram após o tratamento com 10 mg/kg de berberina via intraperitoneal por 21 dias (Bansod *et al.*, 2020). Ainda, a diminuição da marcação imunohistoquímica de TGF β também foi reportada no fígado de ratos com fibrose hepática, os quais receberam 50 mg/kg de berberina, via oral, durante 6 semanas (Eissa *et al.*, 2018).

Com relação ao PCa, o único artigo encontrado até o momento que demonstrou a ação da berberina sob a via do TGF β foi de Liu e colaboradores. Esses autores reportaram diminuição da invasão e migração celular bem como redução de genes como NODAL e WNT1, após tratamento de linhagens celulares de PCa com berberina (Liu *et al.*, 2015). Estes genes podem ser estimulados pelo TGF β e atuarem na transição epitélio-mesenquimal durante a progressão do PCa (Liu *et al.*, 2015). A transição epitélio-mesenquimal é um processo que ocorrem tanto em situações normais como patológicas, e consiste na diferenciação morfológica e funcional de células epiteliais em células mesenquimais (Zhang e Weinberg, 2018). Dessa forma, essas células adquirem capacidade de favorecer processos carcinogênicos como migração e metástase (Zhang e Weinberg, 2018).

Com relação a outros tipos de câncer, Qi e colaboradores trataram células da linhagem de câncer de pulmão A549 com 5 ng/mL de TGF β 1, com posterior administração de berberina nas concentrações de 0, 5, 10 e 20 μ M por 48h, verificando que quando as células receberam TGF β 1, essas apresentaram características mesenquimais (Qi *et al.*, 2014). No entanto, essas células retornaram ao fenótipo epitelial, após a administração de berberina, demonstrando que este composto inibe o processo de transição epitélio-mesenquimal via TGF β 1(Qi *et al.*, 2014).

Outro estudo *in vitro* de células de câncer de mama e tratamento com berberina se verificou redução da expressão de mRNA de TGF β 1, mas não de TGF β 2, o que levou a diminuição da migração celular (Kim *et al.*, 2018). Ainda, os mesmos autores utilizaram o modelo xenográfico de câncer de mama com células altamente invasivas e reportaram que o tratamento com 0,1% de berberina na água, durante 14 dias, suprimiu a mestástase no pulmão, após verificarem a não formação de nódulos neoplásicos pulmonares (Kim *et al.*, 2018).

No presente estudo, demonstramos que o tratamento com berberina diminuiu a ação do TGFβ através da redução proteica dessa molécula, de forma marcante no grupo BC, com redução do TGFβ epitelial e estromal. Isso indicou que a berberina foi capaz de atuar no microambiente de desenvolvimento inicial das neoplasias, sugerindo que a ação da berberina sob a sinalização epitélio-estromal, via supressão do TGFβ, pode ser uma das importantes vias de ação desse composto no PCa.

Com relação aos animais tratados com berberina e que consumiram DH, observamos diminuição estromal do TGFβ, o que sugere que no contexto de desordens metabólicas provocadas pela DH, e considerando o momento da progressão analisado, a berberina pode ter atuado significativamente na sinalização do TGFβ dos fibroblastos e na remodelação tecidual.

Ainda, comprovamos que a berberina foi capaz de atuar na diminuição do TGFβ tecidual, em modelo transgênico de PCa, o qual permite a investigação da progressão do PCa e sua interação com o microambiente estromal. Este fato poderá ser considerado em estudos futuros que tenham por objetivo o entendimento do papel da berberina no atraso da progressão do PCa e outros tipos de canceres, visto que a maior parte dos estudos abordam apenas a expressão gênica das moléculas desta via, se considerando que nem sempre a resposta tecidual é igual a genética.

Com relação às nossas análises do plasma, diminuição da peroxidação lipídica foi observada com a progressão do câncer, caracterizada pela comparação entre os grupos C12 e C16, acompanhada da redução da atividade da GPx. No entanto, as atividades enzimáticas da catalase e SOD não mostraram diferenças significativas nesta comparação.

A eliminação de EROS é mediada principalmente pelas enzimas SOD, catalase e GPx (Md. Asaduzzaman Khan *et al.*, 2010). Neste contexto, inicialmente a SOD catalisa a dismutação do radical superóxido para formar H₂O₂, e este é eliminado pela catalase ou pela via das glutationas via GPx, liberando moléculas de água (Khan *et al.*, 2010). O aumento da peroxidação lipídica e diminuição da atividade plasmática de enzimas antioxidativas tem sido frequentemente demonstrado na literatura no contexto do câncer (Arsova-Sarafinovska *et al.*, 2009). Quando ocorre um desequilíbrio entre a produção e eliminação de EROS, estas podem interagir com o DNA, provocando danos e/ou reagir com a bicamada lipídica da membrana plasmática, promovendo perda de permeabilidade e integridade estrutural, durante o processo de peroxidação lipídica (Barrera, 2012).

Utilizamos o método de TBARS para avaliar o nível de peroxidação lipídica plasmática. Como já discutido anteriormente, diferentes pesquisas já demonstraram que o TBARS aumentou no plasma de pacientes com PCa quando comparado com pessoas saudáveis ou com hiplerplasia prostática benígna (Iynem *et al.*, 2004; Aydin *et al.*, 2006; Ahmed Amar *et al.*, 2019). Apesar disso, é conhecido que em baixos níveis, as EROS são mitogênicas e promovem a proliferação e sobrevivência celular, enquanto que o aumento de EROS promove a diferenciação celular e peroxidação lipídica (Barrera, 2012).

No presente estudo e modelo experimental, a peroxidação lipídica sofreu redução, à nível sistêmico, no animal em fases iniciais da progressão do PCa. Isso se confirma ao observarmos o estadiamento de lesões do grupo C16, o qual demonstra que apesar de haver significativa redução de epitélio saudável do LDL, tanto as neoplasias como o ABD aumentaram numericamente, mas não de modo significativo. Diante do exposto, inferimos que a redução sistêmica de peroxidação lipídica no TRAMP pode estar relacionada com a fase proliferativa ou de desenvolvimento de neoplasias prostáticas. Este achado, deve ser melhor estabelecido através de mais fases experimentais, envolvendo a mensuração das EROS e as fases de progressão tumoral. Porém, nossos resultados abrem caminho para melhor entendimento do processo complexo do estresse oxidativo no PCa, visto que a maior parte dos estudos abordam o câncer em estágio estabelecido ou avançado.

Ainda, a literatura reportou a redução da atividade da GPx e SOD2 plasmáticas em pacientes com PCa, quando comparados com pessoas saudáveis (Aydin *et al.*, 2006) Interessante ressaltar que neste estudo, os autores não observaram alteração significativa na atividade da catalase (Aydin *et al.*, 2006). Oh e colaboradores realizaram uma interessante revisão de 23 estudos sobre padrões das atividades enzimáticas de antioxidantes no plasma de pacientes com PCa e sem a doença (Oh *et al.*, 2016). Como resultado, os autores demonstraram que a catalase e a SOD apresentam variações nos resultados entre

os estudos, mas tendem a reduzir em pacientes com PCa quando comparados ao grupo de pessoas saudáveis (Oh *et al.*, 2016).

Em interessante abordagem, Shukla e demais pesquisadores avaliaram o plasma de homens com idade entre 54-84 anos com NIP de alto grau, os quais foram considerados como grupo de alto risco para desenvolvimento de PCa (Shukla *et al.*, 2020). Ao compararem este grupo de alto risco para PCa com pessoas saudáveis, os autores mostraram que não houve diferença significativa na atividade da catalase, SOD e GPx entre os dois grupos, apesar de tendente redução da catalase no grupo de alto risco. Ainda, o estudo revelou que a peroxidação lipídica também não alterou significativamente (Shukla *et al.*, 2020).

Sekine e colaboradores investigaram a expressão de mRNA da GPx3 em amostras prostáticas de pacientes com PCa e demonstraram que quanto maior o grau da escala de Gleason, menor é a expressão desta enzima (Sekine *et al.*, 2011).

Os presentes resultados demonstraram que no TRAMP, a via das glutationas é a primeira a ser afetada, sistemicamente, pela progressão do PCa, visto que a GPx reduziu de forma significativa, o que pode indicar que nesta fase, o H₂O₂ pode sofrer aumento sistêmico.

Nossos resultados demonstraram ainda que, o consumo da DH aumentou a peroxidação lipídica e a catalase. Interessante ressaltar que a GPx reduziu no grupo CH16 em relação ao grupo CH12, mostrando que a via das glutationas permaneceu menos ativa em relação à progressão do câncer avançado no grupo que consumiu DH.

Assim como verificado nos animais com sobrepeso do presente estudo, a literatura já demonstrou o aumento da peroxidação lipídica no plasma de modelos de camundongos para estudo de obesidade tais como o *diet-induced obesity* o modelo geneticamente modificado *db/db* (Furukawa *et al.*, 2004). Esses resultados sugeriram que no contexto obesidade, o aumento do estresse oxidativo no plasma pode estar relacionado ao aumento da produção de EROS a partir dos adipócitos provenientes gordura acumulada (Furukawa *et al.*, 2004).

Nesse contexto, Chang e colaboradores submeteram camundongos TRAMP à DH pelo período de 6 a 16 semanas de idade (Chang *et al.*, 2014). Os pesquisadores reportaram que a atividade da GPx3 diminuiu no LDL e LA dos animais TRAMP submetidos a DH em relação ao grupo dieta controle. Ainda, a imunomarcação de GPx3 reduziu em todos os lobos prostáticos do grupo DH em relação ao grupo dieta controle (Chang *et al.*, 2014). Em outra abordagem, pesquisadores reportaram a diminuição do mRNA da GPx3 no LDL e LV de camundongos C57Bl/6J submetidos a DH (Sekine *et al.*, 2011). Nossos resultados mostraram que se considerando a progressão rápida do PCa, devido à ingestão de DH, ocorreu aumento sistêmico da atividade da SOD e redução de GPx, o que possivelmente pode ter elevado o nível plasmático de H₂O₂ e peroxidação lipídica. O aumento de H₂O₂ e redução da via das glutationas, pode ser a causa compensatória da ativação da catalase, a qual se encontrou aumentada. Portanto, concluímos que a DH promoveu estresse oxidativo elevado, concomitante com a progressão avançada do PCa no modelo TRAMP, assim como reportado em estudos clínicos aqui apresentados. Esses achados demonstraram que o modelo TRAMP é promissor no estudo dessa via, no contexto de distúrbios metabólicos e progressão PCa.

O tratamento do grupo BC com berberina preveniu a redução da atividade de GPx plasmática, observada no grupo C16, e aumentou a atividade da SOD no plasma desses animais. No entanto, não observamos mudanças significativas após o tratamento do grupo BH.

A regulação do estresse oxidativo pelo tratamento com a berberina já foi demonstrada em ratos com indução de carcinoma de colon (Thirupurasundari *et al.*, 2009). Nesse estudo, os pesquisadores administraram 30 mg/kg de berberina 1 vez por semana durante duas semanas e reportaram a redução do TBARS e o aumento da SOD, catalase e GPx no colon dos animais tratados em relação ao grupo controle (Thirupurasundari *et al.*, 2009).

Em outro contexto, Mahmond e demais pesquisadores, administraram 25 mg/kg e 50 mg/kg de berberina, via oral, por 7 dias consecutivos em ratos Wistar com indução de danos hepáticos por metotrexato (Mahmoud *et al.*, 2017). Como resultados, os autores reportaram o aumento hepático da GPx, GSH e SOD, além da diminuição de peroxidação lipídica, em ambas as doses usadas (Mahmoud *et al.*, 2017).

Em contraste com a ação antioxidante da berberina, demonstrada nos estudos citados, diversas pesquisas reportaram que um dos possíveis mecanismos de indução de apoptose pela berberina se dá pelo aumento de EROS (Jabbarzadeh *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2015). Nesse contexto, Meeran e colaboradores demonstraram que a berberina induziu apoptose em células de PCa através do aumento de EROS, porém não foi observado esse efeito em células epiteliais prostáticas saudáveis, o que indicou que a ação da berberina diferiu dependendo do contexto celular (Meeran *et al.*, 2008).

Sobre o efeito da berberina em animais que consumiram DH, nosso estudo é o primeiro a explorar essa perspectiva em modelo de câncer *in vivo*. Sun e colaboradores reportaram o aumento de EROS, H₂O₂ e SOD2 em células de hepatocarcinoma com adição de ácidos graxos (Sun *et al.*, 2017). Os autores demonstraram que o tratamento dessas células com berberina antes da adição de ácidos graxos, preveniu o aumento de EROS e H_2O_2 e a SOD2 (Sun *et al.*, 2017). Interessante ressaltar que a atividade da SOD total não sofreu alteração com a adição dos ácidos graxos ou com o tratamento com a berberina (Sun *et al.*, 2017).

No entanto, outros estudos demonstraram a ação antioxidante da berberina em roedores submetidos a DH. Nesse contexto, a literatura reportou o aumento da atividade da SOD plasmática e redução do TBARS, de forma dose dependente, em hamsters Golden que consumiram DH e que foram tratados com 50 mg/kg ou 100 mg/kg de berberina durante 6 semanas (Liu *et al.*, 2015). Por outro lado, ratos Sprague-Dawley com indução de diabetes por streptozotocina e submetidos à DH foram tratados com berberina nas doses de 50 mg/kg, 100 mg/kg ou 150 mg/kg (Wang *et al.*, 2011). Os autores demonstraram que os níveis hepáticos da peroxidação lipídica bem como as atividades da SOD, GSH e GSSH não diferiram após os diferentes tratamentos (Wang *et al.*, 2011).

Diante do exposto, nossos resultados sugerem fortemente que no PCa, a ação antioxidante da berberina se dá pela ativação da via das glutationas e não da catalase. Dessa forma, o presente estudo mostrou uma nova perspectiva sobre a ação da berberina no estresse oxidativo sistêmico no microambiente do câncer. Sobre o tratamento do grupo BH, podemos inferir duas possíveis causas para a não efetividade do tratamento sob o estresse oxidativo. A primeira é que a berberina pode atuar neste parâmetro na fase inicial da progressão do câncer e não na agressividade de progressão demonstrada nas análises morfológicas do grupo DH. A segunda perspectiva leva ao questionamento sobre a necessidade de uma dosagem maior do que a utilizada no presente estudo, visto que a maior parte dos resultados aqui discutidos ocorreram de forma dose-dependente e com dosagem superior à do presente estudo (ver Tabela 4 (materiais anexos complementares). Portanto, estudos se fazem necessários para confirmação dessas hipóteses.

Concluindo, os resultados do nosso estudo demonstram que a berberina é potencialmente relevante no atraso do PCa, incluindo animais com desequilíbrio metabólico associado a ingestão de dieta rica em gordura sendo, portanto, uma boa candidata a terapias associativas no tratamento de PCa. A berberina atuou efetivamente na redução da angiogênese e proliferação celular tanto no grupo BC como BH. Porém, com relação ao equilíbrio da insulinemia e estresse oxidativo sistêmico, a dosagem aqui utilizada se fez efetiva apenas no grupo BC. Estes achados demonstraram que a berberina apresentou efeitos diferenciados com relação a vias pontuais na presença ou ausência da DH. Este fato se faz relevante na escolha do momento de administração deste composto, numa possível perspectiva futura de administração clínica da berberina como coadjuvante para o tratamento do PCa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: jabuticaba (Myrciaria jaboticaba (Vell.) Berg). J Sci Food Agric, v. 92, n. 8, p. 1679-87, Jun 2012. ISSN 1097-0010. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173652</u> >.

ABRAMS, S. L. et al. Abilities of berberine and chemically modified berberines to inhibit proliferation of pancreatic cancer cells. **Adv Biol Regul,** v. 71, p. 172-182, Jan 2019. ISSN 2212-4934. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30361003</u> >.

ADHAMI, V. M. et al. Combined inhibitory effects of green tea polyphenols and selective cyclooxygenase-2 inhibitors on the growth of human prostate cancer cells both in vitro and in vivo. **Clin Cancer Res,** v. 13, n. 5, p. 1611-9, Mar 2007. ISSN 1078-0432. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17332308</u> >.

ADHAMI, V. M. et al. Oral consumption of green tea polyphenols inhibits insulin-like growth factor-Iinduced signaling in an autochthonous mouse model of prostate cancer. **Cancer Res,** v. 64, n. 23, p. 8715-22, Dec 01 2004. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15574782</u> >.

AFDAL, A. et al. The Expression of Transforming Growth Factor Beta-1 and Interleukin-6 on Human Prostate: Prostate Hyperplasia and Prostate Cancer. **Open Access Maced J Med Sci**, v. 7, n. 12, p. 1905-1910, Jun 2019. ISSN 1857-9655. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31406527</u> >.

AHMED AMAR, S. A. et al. Determination of oxidative stress levels and some antioxidant enzyme activities in prostate cancer. **Aging Male,** v. 22, n. 3, p. 198-206, Sep 2019. ISSN 1473-0790. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30322333</u> >.

ALASEEM, A. et al. Matrix Metalloproteinases: A challenging paradigm of cancer management. **Semin Cancer Biol,** v. 56, p. 100-115, 06 2019. ISSN 1096-3650. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29155240</u> >.

ALBANES, D. et al. Serum insulin, glucose, indices of insulin resistance, and risk of prostate cancer. **J Natl** Cancer Inst, v. 101, n. 18, p. 1272-9, Sep 2009. ISSN 1460-2105. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19700655</u> >.

ALBUQUERQUE, B. R. et al. Jabuticaba residues (Myrciaria jaboticaba (Vell.) Berg) are rich sources of valuable compounds with bioactive properties. **Food Chem,** v. 309, p. 125735, Mar 2020. ISSN 1873-7072. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31704077</u> >.

ALEZANDRO, M. R.; GRANATO, D.; GENOVESE, M. I. Jaboticaba (Myrciaria jaboticaba (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, improves plasma lipid pro fi le in streptozotocin-mediated oxidative stress in diabetic rats. **Food Research International**, v. 54, p. 650-659, 2013a. Jaboticaba (Myrciaria jaboticaba (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like

fruit, improves plasma lipid profile in streptozotocin-mediatedoxidative stress in diabetic rats. **Food Research International**, v. 54, p. 650–659, 2013b.

ALISEYDI BOZKURT et al. The evaluation of oxidative stress parameters in the benign prostatic hyperplasia, prostatitis and prostate cancer. **Ortadogu Medical Journal**, v. 11 (3), p. 315-321, 2019.

ALLOTT, E. H.; MASKO, E. M.; FREEDLAND, S. J. Obesity and prostate cancer: weighing the evidence. **Eur Urol,** v. 63, n. 5, p. 800-9, May 2013. ISSN 1873-7560. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23219374</u> >.

ALTINTAS, D. M. et al. Differentially expressed androgen-regulated genes in androgen-sensitive tissues reveal potential biomarkers of early prostate cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66278, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23840433</u> >.

AO, M. et al. Cross-talk between paracrine-acting cytokine and chemokine pathways promotes malignancy in benign human prostatic epithelium. **Cancer Res**, v. 67, n. 9, p. 4244-53, May 2007. ISSN 0008-5472. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17483336</u> >.

ARSOVA-SARAFINOVSKA, Z. et al. Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer. **Clin Biochem,** v. 42, n. 12, p. 1228-35, Aug 2009. ISSN 1873-2933. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19465015</u> >.

AYDIN, A. et al. Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **Clin Biochem,** v. 39, n. 2, p. 176-9, Feb 2006. ISSN 0009-9120. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16413012</u> >.

BAIG, M. H. et al. Enzyme targeting strategies for prevention and treatment of cancer: Implications for cancer therapy. **Semin Cancer Biol**, v. 56, p. 1-11, 06 2019. ISSN 1096-3650. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29248538</u> >.

BAIR, E. L. et al. Membrane type 1 matrix metalloprotease cleaves laminin-10 and promotes prostate cancer cell migration. **Neoplasia**, v. 7, n. 4, p. 380-9, Apr 2005. ISSN 1522-8002. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15967115</u> >.

BAKER, A. M.; OBERLEY, L. W.; COHEN, M. B. Expression of antioxidant enzymes in human prostatic adenocarcinoma. **Prostate**, v. 32, n. 4, p. 229-33, Sep 1997. ISSN 0270-4137. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9288180</u> >.

BANSOD, S.; DOIJAD, N.; GODUGU, C. Berberine attenuates severity of chronic pancreatitis and fibrosis via AMPK-mediated inhibition of TGF- β 1/Smad signaling and M2 polarization. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 403, p. 115162, Sep 2020. ISSN 1096-0333. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32721432</u> >.

BAO, X. et al. Tumor suppressor function of laminin-binding alpha-dystroglycan requires a distinct beta3-N-acetylglucosaminyltransferase. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 106, n. 29, p. 12109-14, Jul 2009. ISSN 1091-6490. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19587235</u> >.

BARRERA, G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. **ISRN Oncol**, v. 2012, p. 137289, 2012. ISSN 2090-567X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23119185</u> >.

BARRERA, G. et al. Role of 4-hydroxynonenal-protein adducts in human diseases. **Antioxid Redox Signal**, v. 22, n. 18, p. 1681-702, Jun 2015. ISSN 1557-7716. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25365742</u> >.

_____. Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes, 4-Hydroxynonenal and Malondialdehyde in Aging-Related Disorders. **Antioxidants (Basel),** v. 7, n. 8, Jul 2018. ISSN 2076-3921. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30061536</u> >.

BARRON, D. A.; ROWLEY, D. R. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. **Endocr Relat Cancer,** v. 19, n. 6, p. R187-204, Dec 2012. ISSN 1479-6821. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22930558</u> >.

BASEGGIO, A. M. et al. Jaboticaba peel extract decrease autophagy in white adipose tissue and prevents metabolic disorders in mice fed with a high-fat diet. **Pharma Nutrition**, v. 6, n. 4, p. 147-156, 2018.

BASPINAR, S. et al. Expression of NGF, GDNF and MMP-9 in prostate carcinoma. **Pathol Res Pract,** v. 213, n. 5, p. 483-489, May 2017. ISSN 1618-0631. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28237042</u> >.

BATISTA, A. G. et al. Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. J O U R NA L O F F U N C T I O NA L F O O D S, v. 6, p. 4 5 0 –4 6 1, 2014.

BATISTA, Â. G. et al. Effects of Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel on blood glucose and cholesterol levels in healthy rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 13(37), p. 3805-5315, 2014. ISSN 1684-5315.

_____. Jaboticaba berry peel intake increases short chain fatty acids production and prevent hepatic steatosis in mice fed high-fat diet. **Journal of Functional Foods,** v. 48, p. 266-274, 2018.

BATTISTI, V. et al. Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients: relation to Gleason score, treatment and bone metastasis. **Biomed Pharmacother,** v. 65, n. 7, p. 516-24, Oct 2011. ISSN 1950-6007. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21993000</u> >.

BELWAL, T. et al. Dietary Anthocyanins and Insulin Resistance: When Food Becomes a Medicine. **Nutrients,** v. 9, n. 10, Oct 2017. ISSN 2072-6643. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29023424</u> >.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 6, p. 401-10, Jun 2003. ISSN 1474-175X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778130</u> >.

BERLANGA, A. et al. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Exp Gastroenterol,** v. 7, p. 221-39, 2014. ISSN 1178-7023. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25045276</u> >.

BERMAN-BOOTY, L. D. et al. A review of the existing grading schemes and a proposal for a modified grading scheme for prostatic lesions in TRAMP mice. **Toxicol Pathol**, v. 40, n. 1, p. 5-17, 2012. ISSN 1533-1601. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22021166</u> >.

BHOWMICK, N. A. et al. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. **Science,** v. 303, n. 5659, p. 848-51, Feb 2004. ISSN 1095-9203. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14764882</u> >.

BIANCO, J. J. et al. Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. **Endocrinology**, v. 143, n. 12, p. 4922-33, Dec 2002. ISSN 0013-7227. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446620</u> >.

BOBROWSKA-KORCZAK, B. et al. Lipid peroxidation as a predictive biomarker of the early stage of cancer. J Biol Regul Homeost Agents, v. 33, n. 3, p. 799-810, 2019 May-Jun, 2019. ISSN 0393-974X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31094165</u> >.

BONKHOFF, H. Analytical molecular pathology of epithelial-stromal interactions in the normal and neoplastic prostate. **Anal Quant Cytol Histol,** v. 20, n. 5, p. 437-42, Oct 1998. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9801762</u> >.

BOSTWICK, D. G. et al. Human prostate cancer risk factors. **Cancer**, v. 101, n. 10 Suppl, p. 2371-490, Nov 2004. ISSN 0008-543X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15495199</u> >.

BOVET, P.; CHIOLERO, A.; GEDEON, J. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries. N Engl J Med, v. 377, n. 15, p. 1495-6, 10 2017. ISSN 1533-4406. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29022334</u> >.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov 2018. ISSN 1542-4863. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593</u> >.

BRENT H. DORSETT; IOACHIM, H. L. A Method for the Use of Immunofluorescence on Paraffin-embedded Tissues. **American Journal of Clinical patology**, v. 69, p. 66-72, 1978.

BRUSQ, J. M. et al. Inhibition of lipid synthesis through activation of AMP kinase: an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine. **J Lipid Res**, v. 47, n. 6, p. 1281-8, Jun 2006. ISSN 0022-2275 (Print)

0022-2275 (Linking). Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16508037</u> >.

CAO, Z.; KYPRIANOU, N. Mechanisms navigating the TGF-β pathway in prostate cancer. Asian J Urol, v. 2, n. 1, p. 11-18, Jan 2015. ISSN 2214-3882. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29051866 >.

CAO, Z. G. et al. Comparison of 4-hydroxynonenal-induced p53-mediated apoptosis in prostate cancer cells LNCaP and DU145. Contemp Oncol (Pozn), v. 18, n. 1, p. 22-8, 2014. ISSN 1428-2526. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24876817 >.

CARLBERG, A. L. O. O. P. I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. Methods in Enzymology, v. 113, p. 484-490, 1985.

CARRUBA, G. Estrogens in Prostate Cancer. In: SPRINGER (Ed.). Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective, 2013. chap. Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective, p.369-381.

CARVALHO, C. P. et al. Impaired β -cell- β -cell coupling mediated by Cx36 gap junctions in prediabetic mice. Am J Physiol Endocrinol Metab, v. 303, n. 1, p. E144-51, Jul 2012. ISSN 1522-1555. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22569071 >.

CARVALHO-SILVA, M. T. P. S. C. L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. Food Research International, v. 44, n. 7, p. 1658-1670, 2011.

CATTRINI, C. et al. Current Treatment Options for Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. Cancers 11, 9, Sep 2019. ISSN 2072-6694. Available (Basel), v. n. at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31547436 >.

CHANG, S. N. et al. High animal fat intake enhances prostate cancer progression and reduces glutathione peroxidase 3 expression in early stages of TRAMP mice. Prostate, v. 74, n. 13, p. 1266-77, Sep 2014. ISSN 1097-0045. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25053105 >.

CHEN, C. T. et al. Targeting the IKKβ/mTOR/VEGF signaling pathway as a potential therapeutic strategy for obesity-related breast cancer. Mol Cancer Ther, v. 11, n. 10, p. 2212-21, Oct 2012. ISSN 1538-8514. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22826466 >.

CHEN, G. et al. Modulation of androgen receptor transactivation by FoxH1. A newly identified androgen receptor corepressor. J Biol Chem, v. 280, n. 43, p. 36355-63, Oct 2005. ISSN 0021-9258. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16120611 >.

CHEN, P. N. et al. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. Cancer Lett, v. 235, n. 2, p. 248-59, Apr 2006. ISSN 0304-3835. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15975709 >.

CHHABRA, G. et al. Prostate cancer chemoprevention by natural agents: Clinical evidence and potential implications. Cancer Lett, v. 422, p. 9-18, May 2018. ISSN 1872-7980. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29471004 >.

CHO, H. J. et al. A high-fat diet containing lard accelerates prostate cancer progression and reduces survival rate in mice: possible contribution of adipose tissue-derived cytokines. Nutrients, v. 7, n. 4, p. 2539-61, Apr 09 2015. ISSN 2072-6643 (Electronic)

2072-6643 (Linking). Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25912035 >.

CHOI, B. H. et al. The inhibition of inflammatory molecule expression on 3T3-L1 adipocytes by berberine is not mediated by leptin signaling. Nutr Res Pract, v. 3, n. 2, p. 84-8, 2009. ISSN 2005-6168. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20016706 >.

CHOI, M. S. et al. Berberine inhibits p53-dependent cell growth through induction of apoptosis of prostate cancer cells. Int J Oncol, v. 34, n. 5, p. 1221-30, May 2009. ISSN 1019-6439 (Print) 1019-6439 (Linking). Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19360335 >.

CHRISTODOULIDES, C. et al. Adipogenesis and WNT signalling. Trends Endocrinol Metab, v. 20, n. 1, p. 16-24, Jan 2009. ISSN 1043-2760. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19008118 >.

CHU, S. C. et al. Berberine reverses epithelial-to-mesenchymal transition and inhibits metastasis and tumorinduced angiogenesis in human cervical cancer cells. **Mol Pharmacol**, v. 86, n. 6, p. 609-23, Dec 2014. ISSN 1521-0111. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25217495</u> >.

COSTEA, T. et al. Molecular Mechanisms and Bioavailability of Polyphenols in Prostate Cancer. **Int J Mol Sci,** v. 20, n. 5, Mar 2019. ISSN 1422-0067. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30823649</u> >.

CUNHA, G. R. et al. Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. Acta Anat (Basel), v. 155, n. 1, p. 63-72, 1996. ISSN 0001-5180. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8811117</u> >.

DA SILVA, R. F. et al. Antiangiogenic therapy with Nintedanib affects hypoxia, angiogenesis and apoptosis in the ventral prostate of TRAMP animals. **Cell Tissue Res,** v. 379, n. 2, p. 407-420, Feb 2020. ISSN 1432-0878. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31473819</u> >.

_____. Nintedanib antiangiogenic inhibitor effectiveness in delaying adenocarcinoma progression in Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP). **J Biomed Sci,** v. 24, n. 1, p. 31, May 2017. ISSN 1423-0127. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28499383</u> >.

DEB, G. et al. Green tea-induced epigenetic reactivation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 suppresses prostate cancer progression through histone-modifying enzymes. **Mol Carcinog,** v. 58, n. 7, p. 1194-1207, 07 2019. ISSN 1098-2744. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30854739</u> >.

DI SEBASTIANO, K. M. et al. Glucose impairments and insulin resistance in prostate cancer: the role of obesity, nutrition and exercise. **Obes Rev,** v. 19, n. 7, p. 1008-1016, Jul 2018. ISSN 1467-789X. Available at: <<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29573216</u>>.

DICKERMAN, B. A. et al. Weight change, obesity and risk of prostate cancer progression among men with clinically localized prostate cancer. **Int J Cancer**, v. 141, n. 5, p. 933-944, 09 2017. ISSN 1097-0215. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28543830</u> >.

DOMÍNGUEZ-AVILA, J. A. et al. Modulation of PPAR Expression and Activity in Response to Polyphenolic Compounds in High Fat Diets. **Int J Mol Sci,** v. 17, n. 7, Jun 2016. ISSN 1422-0067. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27367676</u> >.

DONG, L. et al. Diet-induced obesity links to ER positive breast cancer progression via LPA/PKD-1-CD36 signaling-mediated microvascular remodeling. **Oncotarget**, v. 8, n. 14, p. 22550-22562, Apr 2017. ISSN 1949-2553. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28186980</u> >.

DONG, X. et al. Irs1 and Irs2 signaling is essential for hepatic glucose homeostasis and systemic growth. J Clin Invest, v. 116, n. 1, p. 101-14, Jan 2006. ISSN 0021-9738. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16374520</u> >.

DUAN, Y. et al. Inflammatory Links Between High Fat Diets and Diseases. **Front Immunol**, v. 9, p. 2649, 2018. ISSN 1664-3224. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30483273</u> >.

EASTHAM, J. A. et al. Transforming growth factor-beta 1: comparative immunohistochemical localization in human primary and metastatic prostate cancer. **Lab Invest**, v. 73, n. 5, p. 628-35, Nov 1995. ISSN 0023-6837. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7474936</u> >.

EISERMANN, K.; FRAIZER, G. The Androgen Receptor and VEGF: Mechanisms of Androgen-Regulated Angiogenesis in Prostate Cancer. **Cancers (Basel),** v. 9, n. 4, Apr 2017. ISSN 2072-6694. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28394264</u> >.

EISSA, L. A. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of berberine attenuate hepatic fibrosis induced by thioacetamide injection in rats. **Chem Biol Interact,** v. 294, p. 91-100, Oct 2018. ISSN 1872-7786. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30138605</u> >.

ELLEM, S. J.; RISBRIDGER, G. P. Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 118, n. 4-5, p. 246-51, Feb 2010. ISSN 1879-1220. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19896534</u> >.

FACINA, C. H. et al. Long-term oral exposure to safe dose of bisphenol A in association with high-fat diet stimulate the prostatic lesions in a rodent model for prostate cancer. **Prostate**, v. 78, n. 2, p. 152-163, Feb 2018. ISSN 1097-0045. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29148069</u> >.

FAIR, W. R.; COUCH, J.; WEHNER, N. Prostatic antibacterial factor. Identity and significance. **Urology**, v. 7, n. 2, p. 169-77, Feb 1976. ISSN 0090-4295. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/54972</u> >.

FERRUELO, A. et al. Effects of resveratrol and other wine polyphenols on the proliferation, apoptosis and androgen receptor expression in LNCaP cells. **Actas Urol Esp,** v. 38, n. 6, p. 397-404, Jul-Aug 2014. ISSN 1699-7980 (Electronic)

0210-4806 (Linking). Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24726691</u> >.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, May 1957. ISSN 0021-9258. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13428781</u> >.

FRICK, J.; AULITZKY, W. Physiology of the prostate. **Infection**, v. 19 Suppl 3, p. S115-8, 1991. ISSN 0300-8126. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2055645</u> >.

FUJITA, K. et al. Obesity, Inflammation, and Prostate Cancer. **J Clin Med**, v. 8, n. 2, Feb 2019. ISSN 2077-0383. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30736371</u> >.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest**, v. 114, n. 12, p. 1752-61, Dec 2004. ISSN 0021-9738. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15599400</u> >.

GAO, S. et al. Reduced expression of DACT2 promotes hepatocellular carcinoma progression: involvement of methylation-mediated gene silencing. **World J Surg Oncol**, v. 11, p. 57, 2013. ISSN 1477-7819. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23496880</u> >.

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 482, n. 3, p. 419-425, 01 2017. ISSN 1090-2104. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28212725</u> >.

GASPAROVIC, A. C. et al. Cancer growth regulation by 4-hydroxynonenal. **Free Radic Biol Med,** v. 111, p. 226-234, 10 2017. ISSN 1873-4596. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28131901</u> >.

GILL, J. G.; PISKOUNOVA, E.; MORRISON, S. J. Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, v. 81, p. 163-175, 2016. ISSN 1943-4456. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28082378</u> >.

GINGRICH, J. R. et al. Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. **Prostate Cancer Prostatic Dis,** v. 2, n. 2, p. 70-75, Mar 1999. ISSN 1476-5608. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496841</u> >.

_____. Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. **Cancer Res,** v. 56, n. 18, p. 4096-102, Sep 1996. ISSN 0008-5472. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8797572 >.

GODSLAND, I. F. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer. Clin Sci (Lond), v. 118, n. 5, p. 315-32, Nov 2009. ISSN 1470-8736. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19922415</u> >.

GOEL, H. L.; MERCURIO, A. M. VEGF targets the tumour cell. **Nat Rev Cancer,** v. 13, n. 12, p. 871-82, Dec 2013. ISSN 1474-1768. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24263190</u> >.

GOENA, M. et al. Effect of the raw legume Vicia ervilia on muscle and liver protein metabolism in growing rats. **Rev Esp Fisiol,** v. 45 Suppl, p. 55-9, 1989. ISSN 0034-9402. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2484317</u> >.

GRAY, A. L. et al. The polyphenols (-)-epigallocatechin-3-gallate and luteolin synergistically inhibit TGF- β -induced myofibroblast phenotypes through RhoA and ERK inhibition. **PLoS One,** v. 9, n. 10, p. e109208, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25272043</u> >.

GREENBERG, N. M. et al. Prostate cancer in a transgenic mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 8, p. 3439-43, Apr 1995. ISSN 0027-8424. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7724580</u> >.

GREGG, J. R. et al. Diet quality and Gleason grade progression among localised prostate cancer patients on active surveillance. **Br J Cancer,** v. 120, n. 4, p. 466-471, 02 2019. ISSN 1532-1827. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30679782</u> >.

GUAL, P.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; TANTI, J. F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. **Biochimie**, v. 87, n. 1, p. 99-109, Jan 2005. ISSN 0300-9084. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15733744</u> >.

GUCALP, A. et al. Periprostatic adipose inflammation is associated with high-grade prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Dis,** v. 20, n. 4, p. 418-423, 12 2017. ISSN 1476-5608. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28653675</u> >.

GUI-ZHI MA et al. Effect of pomegranate peel polyphenols on human prostate cancer PC-3 cells in vivo. **Food Science and Biotechnology,** v. 24, n. 5, p. 1887–1892, 2015.

GUO, H. H. et al. Liver-target nanotechnology facilitates berberine to ameliorate cardio-metabolic diseases. **Nat Commun,** v. 10, n. 1, p. 1981, 04 2019. ISSN 2041-1723. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31040273</u> >.

HADWAN, M. H.; ABED, H. N. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. **Data Brief,** v. 6, p. 194-9, Mar 2016. ISSN 2352-3409. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26862558</u> >.

HAMSA, T. P.; KUTTAN, G. Antiangiogenic activity of berberine is mediated through the downregulation of hypoxia-inducible factor-1, VEGF, and proinflammatory mediators. **Drug Chem Toxicol**, v. 35, n. 1, p. 57-70, Jan 2012. ISSN 1525-6014 (Electronic)

0148-0545 (Linking). Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22145808 >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000. ISSN 0092-8674. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931</u> >.

HAO, J. et al. Investigation into the mechanism of the loss of laminin 5 (alpha3beta3gamma2) expression in prostate cancer. **Am J Pathol**, v. 158, n. 3, p. 1129-35, Mar 2001. ISSN 0002-9440. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238061</u> >.

HAO, Q. et al. Arctigenin inhibits prostate tumor growth in high-fat diet fed mice through dual actions on adipose tissue and tumor. **Sci Rep,** v. 10, n. 1, p. 1403, Jan 2020. ISSN 2045-2322. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31996731</u> >.

HE, Z. et al. Gallic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenic effects via the PTEN/AKT/HIFlalpha/VEGF signaling pathway in ovarian cancer cells. **Oncol Rep,** v. 35, n. 1, p. 291-7, Jan 2016. ISSN 1791-2431 (Electronic)

1021-335X (Linking). Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26530725</u> >.

HERMAN, J. G.; STADELMAN, H. L.; ROSELLI, C. E. Curcumin blocks CCL2-induced adhesion, motility and invasion, in part, through down-regulation of CCL2 expression and proteolytic activity. **Int J Oncol**, v. 34, n. 5, p. 1319-27, May 2009. ISSN 1019-6439. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19360344</u> >.

HO, C. T. et al. Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. **Prev Med**, v. 21, n. 4, p. 520-5, Jul 1992. ISSN 0091-7435. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1409493</u> >.

HO, Y. T. et al. Berberine induced apoptosis via promoting the expression of caspase-8, -9 and -3, apoptosisinducing factor and endonuclease G in SCC-4 human tongue squamous carcinoma cancer cells. **Anticancer Res,** v. 29, n. 10, p. 4063-70, Oct 2009. ISSN 1791-7530. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19846952</u> >.

HONG-SHENG CHEN et al. Ellagic Acid Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis Through TGF-β/Smad3 Signaling Pathway in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. **International Journal of Oncology**, v. 46, p. 1730-1738, 2015.

HONMA, M. et al. Selective insulin resistance with differential expressions of IRS-1 and IRS-2 in human NAFLD livers. **Int J Obes (Lond)**, May 2018. ISSN 1476-5497. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29717275</u> >.

HSING, A. W. Hormones and prostate cancer: what's next? **Epidemiol Rev,** v. 23, n. 1, p. 42-58, 2001. ISSN 0193-936X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11588854</u> >.

HU, M. B. et al. High-fat diet-induced adipokine and cytokine alterations promote the progression of prostate cancer. **Oncol Lett,** v. 15, n. 2, p. 1607-1615, Feb 2018. ISSN 1792-1074. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29434856</u> >.

HU, Y.; DAVIES, G. E. Berberine inhibits adipogenesis in high-fat diet-induced obesity mice. **Fitoterapia**, v. 81, n. 5, p. 358-66, Jul 2010. ISSN 1873-6971. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19861153</u> >.

HU, Y. et al. Metformin and berberine prevent olanzapine-induced weight gain in rats. **PLoS One,** v. 9, n. 3, p. e93310, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24667776</u> >.

HUANG, M. et al. A high-fat diet enhances proliferation of prostate cancer cells and activates MCP-1/CCR2 signaling. **Prostate**, v. 72, n. 16, p. 1779-88, Dec 2012. ISSN 1097-0045. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22514016</u> >.

HUGUET, E. L. et al. Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. **Cancer Res,** v. 54, n. 10, p. 2615-21, May 1994. ISSN 0008-5472. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8168088</u> >.

HUSS, W. J. et al. Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch. **Cancer Res,** v. 61, n. 6, p. 2736-43, Mar 2001. ISSN 0008-5472. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11289156</u> >.

ILYAS, Z. et al. The effect of Berberine on weight loss in order to prevent obesity: A systematic review. **Biomed Pharmacother**, v. 127, p. 110137, Jul 2020. ISSN 1950-6007. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32353823</u> >.

IMENSHAHIDI, M.; HOSSEINZADEH, H. Berberine and barberry (Berberis vulgaris): A clinical review. **Phytother Res,** v. 33, n. 3, p. 504-523, Mar 2019. ISSN 1099-1573. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30637820</u> >.

ISHII, K. et al. Role of Stromal Paracrine Signals in Proliferative Diseases of the Aging Human Prostate. J Clin Med, v. 7, n. 4, Apr 2018. ISSN 2077-0383. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29614830</u> >.

IYNEM, A. H. et al. The effect of prostate cancer and antiandrogenic therapy on lipid peroxidation and antioxidant systems. **Int Urol Nephrol,** v. 36, n. 1, p. 57-62, 2004. ISSN 0301-1623. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15338676</u> >.

JABBARZADEH KABOLI, P. et al. Targets and mechanisms of berberine, a natural drug with potential to treat cancer with special focus on breast cancer. **Eur J Pharmacol**, v. 740, p. 584-95, Oct 2014. ISSN 1879-0712. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24973693</u> >.

JACKSON, M. W.; BENTEL, J. M.; TILLEY, W. D. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **J Urol**, v. 157, n. 6, p. 2323-8, Jun 1997. ISSN 0022-5347. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9146664</u> >.

JEET, V.; RUSSELL, P. J.; KHATRI, A. Modeling prostate cancer: a perspective on transgenic mouse models. **Cancer Metastasis Rev,** v. 29, n. 1, p. 123-42, Mar 2010. ISSN 1573-7233. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20143131</u> >.

JH, Z. Biostatistical Analysis. New Jersey, USA: 1999.

JIA, Y. et al. Epigenetic regulation of DACT2, a key component of the Wnt signalling pathway in human lung cancer. **J Pathol,** v. 230, n. 2, p. 194-204, Jun 2013. ISSN 1096-9896. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22806826</u> >.

JIANG, X. et al. DACT3 is an epigenetic regulator of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer and is a therapeutic target of histone modifications. **Cancer Cell**, v. 13, n. 6, p. 529-41, Jun 2008. ISSN 1878-3686. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18538736</u> >.

JIN, F. et al. Berberine inhibits angiogenesis in glioblastoma xenografts by targeting the VEGFR2/ERK pathway. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, p. 665–671, 2018.

JONES, E.; PU, H.; KYPRIANOU, N. Targeting TGF-beta in prostate cancer: therapeutic possibilities during tumor progression. **Expert Opin Ther Targets,** v. 13, n. 2, p. 227-34, Feb 2009. ISSN 1744-7631. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236240</u> >.

JUNG, K. et al. Antioxidant enzymes in malignant prostate cell lines and in primary cultured prostatic cells. **Free Radic Biol Med,** v. 23, n. 1, p. 127-33, 1997. ISSN 0891-5849. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9165305</u> >.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**, v. 11, n. 4, p. 447-55, Jul 1979. ISSN 0018-2214. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/91593</u> >.

KAMPA, M. et al. Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. **Nutr Cancer,** v. 37, n. 2, p. 223-33, 2000. ISSN 0163-5581. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11142097</u> >.

KAPLAN-LEFKO, P. J. et al. Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model. **Prostate**, v. 55, n. 3, p. 219-37, May 2003. ISSN 0270-4137. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692788</u> >.

KARAMANOS, N. K. et al. Matrix modeling and remodeling: A biological interplay regulating tissue homeostasis and diseases. **Matrix Biol,** v. 75-76, p. 1-11, 01 2019. ISSN 1569-1802. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30130584</u> >.

KAVANAGH, J. P. Sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, citrate and chloride content of human prostatic and seminal fluid. **J Reprod Fertil,** v. 75, n. 1, p. 35-41, Sep 1985. ISSN 0022-4251. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4032375</u> >.

KIDO, L. A. et al. Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP) model: A good alternative to study PCa progression and chemoprevention approaches. **Life Sci,** v. 217, p. 141-147, Jan 2019. ISSN 1879-0631. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30528182</u> >.

_____. Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP) model: A good alternative to study PCa progression and chemoprevention approaches. Life Science, v. 217, p. 141-147, 2019.

_____. Anti-inflammatory therapies in TRAMP mice: delay in prostate cancer progression. **Endocr Relat Cancer**, Jan 2016. ISSN 1479-6821. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26772819</u> >.

KIDO, Y. et al. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. J Clin Invest, v. 105, n. 2, p. 199-205, Jan 2000. ISSN 0021-9738. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10642598</u> >.

KIM, S. et al. Berberine Suppresses Cell Motility Through Downregulation of TGF-β1 in Triple Negative Breast Cancer Cells. **Cell Physiol Biochem**, v. 45, n. 2, p. 795-807, 2018. ISSN 1421-9778. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29414799</u> >.

KIVIMÄE, S.; YANG, X. Y.; CHEYETTE, B. N. All Dact (Dapper/Frodo) scaffold proteins dimerize and exhibit conserved interactions with Vangl, Dvl, and serine/threonine kinases. **BMC Biochem**, v. 12, p. 33, Jun 2011. ISSN 1471-2091. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21718540</u> >.

KLEINMAN, H. K.; WEEKS, B. S. Laminin: structure, functions and receptors. **Curr Opin Cell Biol**, v. 1, n. 5, p. 964-7, Oct 1989. ISSN 0955-0674. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2534046</u> >.

KOLONIN, M. G.; DIGIOVANNI, J. The role of adipose stroma in prostate cancer aggressiveness. **Transl Androl Urol,** v. 8, n. Suppl 3, p. S348-S350, Jul 2019. ISSN 2223-4691. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31392166</u> >.

KREBS-SMITH, S. M. et al. Update of the Healthy Eating Index: HEI-2015. J Acad Nutr Diet, v. 118, n. 9, p. 1591-1602, 09 2018. ISSN 2212-2672. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30146071</u> >.

KUMARI, S. et al. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. **Biomark Insights,** v. 13, p. 1177271918755391, 2018. ISSN 1177-2719. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29449774</u> >.

KURITA, T. et al. Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male and female reproductive system. **Cell Death Differ,** v. 8, n. 2, p. 192-200, Feb 2001. ISSN 1350-9047. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11313721</u> >.

LABBÉ, D. P. et al. Role of diet in prostate cancer: the epigenetic link. **Oncogene**, v. 34, n. 36, p. 4683-91, Sep 2015. ISSN 1476-5594. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25531313</u> >.

LAGATHU, C. et al. Dact1, a nutritionally regulated preadipocyte gene, controls adipogenesis by coordinating the Wnt/beta-catenin signaling network. **Diabetes,** v. 58, n. 3, p. 609-19, Mar 2009. ISSN 1939-327X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19073771</u> >.

LALL, R. K. et al. Dietary polyphenols in prevention and treatment of prostate cancer. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 2, p. 3350-76, Feb 2015. ISSN 1422-0067. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25654230</u> >.

LAMAS, C. A. et al. Brazilian berry extract (Myrciaria jaboticaba): A promising therapy to minimize prostatic inflammation and oxidative stress. **Prostate**, May 2020. ISSN 1097-0045. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32460430</u> >.

_____. A jaboticaba extract prevents prostatic damage associated with aging and high-fat diet intake. **Food Funct**, Jan 2020. ISSN 2042-650X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32003372</u> >.

_____. Jaboticaba extract prevents prediabetes and liver steatosis in high-fat-fed aging mice. Journal of functional foods, p. 1756-4646, 2018.

LASKER, S. et al. High-fat diet-induced metabolic syndrome and oxidative stress in obese rats are ameliorated by yogurt supplementation. **Sci Rep,** v. 9, n. 1, p. 20026, Dec 2019. ISSN 2045-2322. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31882854</u> >.

LAUDES, M. Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. **J Mol Endocrinol,** v. 46, n. 2, p. R65-72, Apr 2011. ISSN 1479-6813. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21247979</u> >.

LAURENT, V. et al. Periprostatic Adipose Tissue Favors Prostate Cancer Cell Invasion in an Obesity-Dependent Manner: Role of Oxidative Stress. **Mol Cancer Res,** v. 17, n. 3, p. 821-835, 03 2019. ISSN 1557-3125. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30606769</u> >.

LEAV, I. et al. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. **Am J Pathol**, v. 159, n. 1, p. 79-92, Jul 2001. ISSN 0002-9440. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11438457</u> >.

LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. **Endocrinol Metab Clin North Am,** v. 40, n. 3, p. 565-75, viii-ix, Sep 2011. ISSN 1558-4410. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889721</u> >.

LEITE, A. V. et al. Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (Myrciaria jaboticaba Vell Berg). **J Agric Food Chem,** v. 59, n. 6, p. 2277-83, Mar 2011. ISSN 1520-5118. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21291234</u> >.

LEITE-LEGATTI, A. V. et al. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, p. 596–603, 2012. ISSN 0963-9969.

LENG, S. H.; LU, F. E.; XU, L. J. Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion. Acta Pharmacol Sin, v. 25, n. 4, p. 496-502, Apr 2004. ISSN 1671-4083. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066220</u> >.

LENGYEL, E. et al. Cancer as a Matter of Fat: The Crosstalk between Adipose Tissue and Tumors. **Trends Cancer**, v. 4, n. 5, p. 374-384, 05 2018. ISSN 2405-8025. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29709261</u> >.

LENQUISTE, S. A. et al. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food Research International**, v. 49, p. 153–160, 2012.

_____. Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract shows in vitro and in vivo antioxidant properties in obesity model. **Food Research International**, v. 77, p. 162-170, 2015.

LEWIS, M. E.; SHERMAN, T. G.; WATSON, S. J. In situ hybridization histochemistry with synthetic oligonucleotides: strategies and methods. **Peptides**, v. 6 Suppl 2, p. 75-87, 1985. ISSN 0196-9781. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4080619</u> >.

LI, J. et al. Berberine suppresses androgen receptor signaling in prostate cancer. **Mol Cancer Ther,** v. 10, n. 8, p. 1346-56, Aug 2011. ISSN 1538-8514 (Electronic) 1535-7163 (Linking). Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21613449</u> >.

LI, R. N. et al. DACT1 Overexpression in type I ovarian cancer inhibits malignant expansion and cis-platinum resistance by modulating canonical Wnt signalling and autophagy. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 9285, 08 2017. ISSN 2045-2322. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28839145</u> >.

LI, W. W. et al. Tumor angiogenesis as a target for dietary cancer prevention. **J Oncol,** v. 2012, p. 879623, 2012. ISSN 1687-8469. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21977033</u> >.

LI, X. et al. Metabolic characterization and pathway analysis of berberine protects against prostate cancer. **Oncotarget,** v. 8, n. 39, p. 65022-65041, Sep 2017. ISSN 1949-2553. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29029409</u> >.

LIAO, D.; JOHNSON, R. S. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. **Cancer Metastasis Rev,** v. 26, n. 2, p. 281-90, Jun 2007. ISSN 0167-7659. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17603752</u> >.

LIU, C. et al. Flavonoid-Rich Extract of Paulownia fortunei Flowers Attenuates Diet-Induced Hyperlipidemia, Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Obesity Mice by AMPK Pathway. **Nutrients,** v. 9, n. 9, Aug 2017. ISSN 2072-6643. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28867797</u> >.

_____. Effects of berberine on amelioration of hyperglycemia and oxidative stress in high glucose and high fat diet-induced diabetic hamsters in vivo. **Biomed Res Int,** v. 2015, p. 313808, 2015. ISSN 2314-6141. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25705654</u> >.

LIU, C. H. et al. Berberine inhibits the metastatic ability of prostate cancer cells by suppressing epithelial-tomesenchymal transition (EMT)-associated genes with predictive and prognostic relevance. **Int J Med Sci**, v. 12, n. 1, p. 63-71, 2015. ISSN 1449-1907. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25552920</u> >.

LIU, D. et al. A Natural Isoquinoline Alkaloid With Antitumor Activity: Studies of the Biological Activities of Berberine. **Front Pharmacol,** v. 10, p. 9, 2019. ISSN 1663-9812. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30837865</u> >.

_____. Berberine Modulates Gut Microbiota and Reduces Insulin Resistance via the TLR4 Signaling Pathway. **Exp Clin Endocrinol Diabetes,** v. 126, n. 8, p. 513-520, Sep 2018. ISSN 1439-3646. Available at: <<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29365334</u>>.

LIU, L. Z. et al. Berberine modulates insulin signaling transduction in insulin-resistant cells. **Mol Cell Endocrinol,** v. 317, n. 1-2, p. 148-53, Apr 2010. ISSN 1872-8057. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036710</u> >.

LIU, Y. et al. Berberine suppresses colon cancer cell proliferation by inhibiting the SCAP/SREBP-1 signaling pathway-mediated lipogenesis. **Biochem Pharmacol**, v. 174, p. 113776, Apr 2020. ISSN 1873-2968. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31874145</u> >.

LIU, Y.; WU, X.; JIANG, H. High dietary fat intake lowers serum equol concentration and promotes prostate carcinogenesis in a transgenic mouse prostate model. **Nutr Metab** (Lond), v. 16, p. 24, 2019. ISSN 1743-7075. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31011360</u> >.

LIU, Y.; ZUCKIER, L. S.; GHESANI, N. V. Dominant uptake of fatty acid over glucose by prostate cells: a potential new diagnostic and therapeutic approach. **Anticancer Res,** v. 30, n. 2, p. 369-74, Feb 2010. ISSN 1791-7530. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20332441</u> >.

LOPHATANANON, A. et al. Dietary fat and early-onset prostate cancer risk. **Br J Nutr**, v. 103, n. 9, p. 1375-80, May 2010. ISSN 1475-2662. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20082736</u> >.

LU, W.; DU, S.; WANG, J. Berberine inhibits the proliferation of prostate cancer cells and induces G_0/G_1 or G_2/M phase arrest at different concentrations. **Mol Med Rep**, v. 11, n. 5, p. 3920-4, May 2015. ISSN 1791-3004. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25572870</u> >.

LUNA-VITAL, D.; WEISS, M.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Anthocyanins from Purple Corn Ameliorated Tumor Necrosis Factor- α -Induced Inflammation and Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes via Activation of Insulin Signaling and Enhanced GLUT4 Translocation. **Mol Nutr Food Res**, v. 61, n. 12, Dec 2017. ISSN 1613-4133. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28759152</u> >.

MA, W. et al. Berberine inhibits the proliferation and migration of breast cancer ZR-75-30 cells by targeting Ephrin-B2. **Phytomedicine**, v. 25, p. 45-51, Feb 2017. ISSN 1618-095X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28190470</u> >.

MACIEJCZYK, M. et al. Redox Balance, Antioxidant Defense, and Oxidative Damage in the Hypothalamus and Cerebral Cortex of Rats with High Fat Diet-Induced Insulin Resistance. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2018, p. 6940515, 2018. ISSN 1942-0994. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30271528</u> >.

MAHMOUD, A. M.; HOZAYEN, W. G.; RAMADAN, S. M. Berberine ameliorates methotrexate-induced liver injury by activating Nrf2/HO-1 pathway and PPAR_γ, and suppressing oxidative stress and apoptosis in

rats. **Biomed Pharmacother**, v. 94, p. 280-291, Oct 2017. ISSN 1950-6007. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28763751</u> >.

MAKEY, K. L. et al. Increased plasma levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sFlt-1) in women by moderate exercise and increased plasma levels of vascular endothelial growth factor in overweight/obese women. **Eur J Cancer Prev,** v. 22, n. 1, p. 83-9, Jan 2013. ISSN 1473-5709. Available at: <<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22609636</u>>.

MANDEL, A. et al. The interplay between AR, EGF receptor and MMP-9 signaling pathways in invasive prostate cancer. **Mol Med,** v. 24, n. 1, p. 34, 06 2018. ISSN 1528-3658. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30134822</u> >.

MAO, L. et al. Berberine decelerates glucose metabolism via suppression of mTOR-dependent HIF-1 α protein synthesis in colon cancer cells. **Oncol Rep**, v. 39, n. 5, p. 2436-2442, May 2018. ISSN 1791-2431. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29565467</u> >.

MARKER, P. C. et al. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Dev Biol**, v. 253, n. 2, p. 165-74, Jan 2003. ISSN 0012-1606. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12645922</u> >.

MATEUS, P. A. M. et al. Association of anti-inflammatory and antiangiogenic therapies negatively influences prostate cancer progression in TRAMP mice. **Prostate**, v. 79, n. 5, p. 515-535, Apr 2019. ISSN 1097-0045. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30585351</u> >.

MCNEAL, J. E. Normal histology of the prostate. **Am J Surg Pathol**, v. 12, n. 8, p. 619-33, Aug 1988. ISSN 0147-5185. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2456702</u> >.

MCNEAL, J. E. et al. Patterns of progression in prostate cancer. **Lancet**, v. 1, n. 8472, p. 60-3, Jan 1986. ISSN 0140-6736. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2867314</u> >.

MD. ASADUZZAMAN KHAN et al. Antioxidant Enzymes and Cancer. Chinese Journal of Cancer Research, v. 22, p. 87-92, 2010.

MEERAN, S. M.; KATIYAR, S.; KATIYAR, S. K. Berberine-induced apoptosis in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species generation. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 229, n. 1, p. 33-43, May 2008. ISSN 0041-008X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18275980</u> >.

MELEGH, Z.; OLTEAN, S. Targeting Angiogenesis in Prostate Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 11, May 2019. ISSN 1422-0067. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31151317</u> >.

MEMON, M. A. et al. Methylglyoxal and insulin resistance in berberine-treated type 2 diabetic patients. **J Res** Med Sci, v. 23, p. 110, 2018. ISSN 1735-1995. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30693045</u> >.

MIAR, A. et al. Manganese superoxide dismutase (SOD2/MnSOD)/catalase and SOD2/GPx1 ratios as biomarkers for tumor progression and metastasis in prostate, colon, and lung cancer. **Free Radic Biol Med,** v. 85, p. 45-55, Aug 2015. ISSN 1873-4596. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25866291</u> >.

MIYATA, Y. et al. Anti-Cancer Effects of Green Tea Polyphenols Against Prostate Cancer. **Molecules**, v. 24, n. 1, Jan 2019. ISSN 1420-3049. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30621039</u> >.

MONDUL, A. M. et al. Serum total and HDL cholesterol and risk of prostate cancer. **Cancer Causes Control**, v. 22, n. 11, p. 1545-52, Nov 2011. ISSN 1573-7225. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21915616</u> >.

MONTICO, F. et al. Hormonal therapy in the senescence: Prostatic microenvironment structure and adhesion molecules. **Micron**, v. 42, n. 6, p. 642-55, Aug 2011. ISSN 1878-4291. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21489806</u> >.

. Prostatic angiogenic responses in late life: antiangiogenic therapy influences and relation with the glandular microenvironment in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model. Prostate, 484-99, ISSN 1097-0045. 5, Apr 2015. Available v. 75, n. p. at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25521760 >.

_____. Reactive stroma in the prostate during late life: The role of microvasculature and antiangiogenic therapy influences. **Prostate**, v. 75, n. 14, p. 1643-61, Oct 2015. ISSN 1097-0045. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26184673</u> >.

MOON, C. M. et al. Metabolic biomarkers for non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet: In vivo magnetic resonance spectroscopy of hyperpolarized [1-. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 482, n. 1, p. 112-119, Jan 2017. ISSN 1090-2104. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27562716</u> >.

MORGIA, G. et al. Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. **Urol Res,** v. 33, n. 1, p. 44-50, Feb 2005. ISSN 0300-5623. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15517230</u> >.

MORTAZAVI, H. et al. Potential cytotoxic and anti-metastatic effects of berberine on gynaecological cancers with drug-associated resistance. **Eur J Med Chem,** v. 187, p. 111951, Feb 2020. ISSN 1768-3254. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31821990</u> >.

MRAZ, M. et al. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 390, n. 1, p. 1-4, Dec 2009. ISSN 1090-2104. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19769940</u> >.

NARITA, S. et al. Research Evidence on High-Fat Diet-Induced Prostate Cancer Development and Progression. J Clin Med, v. 8, n. 5, Apr 2019. ISSN 2077-0383. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31052319</u> >.

NASSAR, Z. D. et al. Peri-prostatic adipose tissue: the metabolic microenvironment of prostate cancer. **BJU** Int, v. 121 Suppl 3, p. 9-21, 05 2018. ISSN 1464-410X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29460324</u> >.

NOGUEIRA PANGRAZI, E. et al. Nintedanib treatment delays prostate dorsolateral lobe cancer progression in the TRAMP model: contribution to the epithelial-stromal interaction balance. **Cell Biol Int,** v. 42, n. 2, p. 153-168, Feb 2018. ISSN 1095-8355. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28980742</u> >.

NOGUEIRA-LIMA, E. et al. High-fat diet effects on the prostatic adenocarcinoma model and jaboticaba peel extract intake: protective response in metabolic disorders and liver histopathology. **Nutr Cancer**, p. 1-12, Nov 2019. ISSN 1532-7914. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31696743</u> >.

OBERLEY, T. D. et al. Localization of antioxidant enzymes and oxidative damage products in normal and malignant prostate epithelium. **Prostate,** v. 44, n. 2, p. 144-55, Jul 2000. ISSN 0270-4137. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10881024</u> >.

OCHOA-HERNÁNDEZ, A. B. et al. [WNT-β-catenin signaling pathway and its relationship with cancer]. Cir Cir, v. 80, n. 4, p. 389-98, 2012 Jul-Aug 2012. ISSN 0009-7411. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23374390 >.

OH, B. et al. Oxidative stress in prostate cancer patients: A systematic review of case control studies. Prostate Int, v. 4. n. 3, p. 71-87, Sep 2016. ISSN 2287-8882. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27689064 >.

OH, W. K. et al. Elevated plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels predict decreased survival in castration-resistant prostate cancer patients. **Cancer**, v. 117, n. 3, p. 517-25, Feb 2011. ISSN 0008-543X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20862742</u> >.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem,** v. 95, n. 2, p. 351-8, Jun 1979. ISSN 0003-2697. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36810</u> >.

OLIVEIRA, D. S. et al. The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. **Bosn J Basic Med Sci,** v. 16, n. 1, p. 8-13, Feb 2016. ISSN 1840-4812. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26773172</u> >.

OLUMI, A. F. et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. **Cancer Res,** v. 59, n. 19, p. 5002-11, Oct 1999. ISSN 0008-5472. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10519415</u> >.

PAPAGEORGIS, P. TGF β Signaling in Tumor Initiation, Epithelial-to-Mesenchymal Transition, and Metastasis. **J Oncol**, v. 2015, p. 587193, 2015. ISSN 1687-8450. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25883652</u> >.

PARK, H. et al. A high-fat diet increases angiogenesis, solid tumor growth, and lung metastasis of CT26 colon cancer cells in obesity-resistant BALB/c mice. **Mol Carcinog,** v. 51, n. 11, p. 869-80, Nov 2012. ISSN 1098-2744. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21919080</u> >.

PARK, S. H. et al. Effects of dietary high fat on prostate intraepithelial neoplasia in TRAMP mice. Lab Anim Res, v. 29, n. 1, p. 39-47, Mar 2013. ISSN 1738-6055. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23573107 >.

PATIL, J. B.; KIM, J.; JAYAPRAKASHA, G. K. Berberine induces apoptosis in breast cancer cells (MCF-7) through mitochondrial-dependent pathway. **Eur J Pharmacol**, v. 645, n. 1-3, p. 70-8, Oct 2010. ISSN 1879-0712. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20691179</u> >.

PEGO, E. R.; FERNÁNDEZ, I.; NÚÑEZ, M. J. Molecular basis of the effect of MMP-9 on the prostate bone metastasis: A review. **Urol Oncol**, v. 36, n. 6, p. 272-282, 06 2018. ISSN 1873-2496. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29650324</u> >.

PENG, P. L. et al. Synergistic tumor-killing effect of radiation and berberine combined treatment in lung cancer: the contribution of autophagic cell death. **Int J Radiat Oncol Biol Phys,** v. 70, n. 2, p. 529-42, Feb 2008. ISSN 0360-3016. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18207031</u> >.

PEREIRA, S. et al. Modulation of adipose tissue inflammation by FOXP3+ Treg cells, IL-10, and TGF- β in metabolically healthy class III obese individuals. **Nutrition**, v. 30, n. 7-8, p. 784-90, 2014 Jul-Aug 2014. ISSN 1873-1244. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24984993</u> >.

PETTAZZONI, P. et al. Nuclear factor erythroid 2-related factor-2 activity controls 4-hydroxynonenal metabolism and activity in prostate cancer cells. **Free Radic Biol Med,** v. 51, n. 8, p. 1610-8, Oct 2011. ISSN 1873-4596. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21816220</u> >.

PETTINELLI, P.; VIDELA, L. A. Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. J Clin Endocrinol Metab, ISSN Available 1424-30, May 2011. 1945-7197. 96, n. 5, p. at: v. < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21325464 >.

PLAZA, M. et al. Characterization of antioxidant polyphenols from Myrciaria jaboticaba peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: A pilot clinical study. **Food Chem,** v. 211, p. 185-97, Nov 2016. ISSN 0308-8146. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27283622</u> >.

PONZIANI, F. R. et al. Physiology and pathophysiology of liver lipid metabolism. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol,** v. 9, n. 8, p. 1055-67, 2015. ISSN 1747-4132. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26070860</u> >.

PRINS, G. S.; KORACH, K. S. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. **Steroids,** v. 73, n. 3, p. 233-44, Mar 2008. ISSN 0039-128X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18093629</u> >.

PRIOR, R. L. et al. Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. **J Agric Food Chem,** v. 58, n. 7, p. 3970-6, Apr 2010. ISSN 1520-5118. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20148514</u> >.

QI, H. W. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition markers to predict response of Berberine in suppressing lung cancer invasion and metastasis. **J Transl Med,** v. 12, p. 22, Jan 2014. ISSN 1479-5876. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24456611</u> >.

QIN, L. et al. A deep investigation into the adipogenesis mechanism: profile of microRNAs regulating adipogenesis by modulating the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. **BMC Genomics,** v. 11, p. 320, May 2010. ISSN 1471-2164. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20492721</u> >.

QIN, Y. et al. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. **Am J Clin Nutr**, v. 90, n. 3, p. 485-92, Sep 2009. ISSN 1938-3207. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19640950 >.

RAHMAN, A. et al. Critical role of H. **Free Radic Biol Med**, v. 134, p. 527-544, 04 2019. ISSN 1873-4596. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30735839</u> >.

RAHMAN, N.; JEON, M.; KIM, Y. S. Delphinidin, a major anthocyanin, inhibits 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation through activation of Wnt/ β -catenin signaling. **Biofactors**, v. 42, n. 1, p. 49-59, 2016 Jan-Feb 2016. ISSN 1872-8081. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26816335</u> >.

RANI, V. et al. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. Life Sci, v. 148, p. 183-93, Mar 2016. ISSN 1879-0631. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26851532</u> >.

RAWLA, P. Epidemiology of Prostate Cancer. **World J Oncol**, v. 10, n. 2, p. 63-89, Apr 2019. ISSN 1920-454X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31068988</u> >.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993. ISSN 0022-3166. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229312 >.

REIS, S. T. et al. Tgf- β 1 expression as a biomarker of poor prognosis in prostate cancer. Clinics (Sao Paulo), v. 66, n. 7, p. 1143-7, 2011. ISSN 1980-5322. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21876965 >.

REN, F. et al. Tea polyphenols down-regulate the expression of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. **Oncogene**, v. 19, n. 15, p. 1924-32, Apr 2000. ISSN 0950-9232. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10773882</u> >.

RIBEIRO, D. L. et al. High fat-induced obesity associated with insulin-resistance increases FGF-2 content and causes stromal hyperplasia in rat ventral prostate. **Cell Tissue Res**, v. 349, n. 2, p. 577-88, Aug 2012. ISSN 1432-0878. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22661309</u> >.

RIBEIRO, R.; LOPES, C.; MEDEIROS, R. The link between obesity and prostate cancer: the leptin pathway and therapeutic perspectives. **Prostate Cancer Prostatic Dis,** v. 9, n. 1, p. 19-24, 2006. ISSN 1365-7852. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16344847</u> >.

RIPPLE, M. O. et al. Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. **J Natl Cancer Inst,** v. 89, n. 1, p. 40-8, Jan 1997. ISSN 0027-8874. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8978405</u> >.

ROUSSELLE, P.; SCOAZEC, J. Y. Laminin 332 in cancer: When the extracellular matrix turns signals from cell anchorage to cell movement. **Semin Cancer Biol**, Oct 2019. ISSN 1096-3650. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31639412</u> >.

RUSSO, G. et al. Angiogenesis in prostate cancer: onset, progression and imaging. **BJU Int**, v. 110, n. 11 Pt C, p. E794-808, Dec 2012. ISSN 1464-410X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22958524</u> >.

RUSSO, G. I. et al. Relationship between non-alcoholic fatty liver disease and benign prostatic hyperplasia/lower urinary tract symptoms: new insights from an Italian cross-sectional study. World J Urol, v. 33. n. 5, p. 743-51, May 2015. ISSN 1433-8726. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25189458 >.

SAIJUN MO; CUI, Z. Regulation of Canonical Wnt Signaling

During Development and Diseases. In: SATO, D. K.-I. (Ed.). Embryogenesis: InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0466-7.

SARKAR, C. et al. Angiogenesis Inhibition in Prostate Cancer: An Update. **Cancers (Basel)**, v. 12, n. 9, Aug 2020. ISSN 2072-6694. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32842503</u> >.

SCHNEIDER, J. A.; LOGAN, S. K. Revisiting the role of Wnt/ β -catenin signaling in prostate cancer. **Mol** Cell Endocrinol, v. 462, n. Pt A, p. 3-8, 02 2018. ISSN 1872-8057. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28189566</u> >.

SCHNOELLER, T. J. et al. Influence of serum cholesterol level and statin treatment on prostate cancer aggressiveness. **Oncotarget,** v. 8, n. 29, p. 47110-47120, Jul 2017. ISSN 1949-2553. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28445145</u> >.

SCHUBERT, F. R. et al. Dact genes are chordate specific regulators at the intersection of Wnt and Tgf- β signaling pathways. **BMC Evol Biol,** v. 14, p. 157, 2014. ISSN 1471-2148. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25099342</u> >.

SCHUSSEL, J. L. et al. Expression and epigenetic regulation of DACT1 and DACT2 in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Biomark,** v. 15, n. 1, p. 11-7, 2015. ISSN 1875-8592. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25524937</u> >.

SEKINE, Y. et al. High fat diet reduces the expression of glutathione peroxidase 3 in mouse prostate. **Prostate**, v. 71, n. 14, p. 1499-509, Oct 2011. ISSN 1097-0045. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21374652</u> >.

SENGUPTA, D. et al. Modulation of adenylate cyclase signaling in association with MKK3/6 stabilization under combination of SAC and berberine to reduce HepG2 cell survivability. **Apoptosis**, v. 22, n. 11, p. 1362-1379, Nov 2017. ISSN 1573-675X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28836036</u> >.

SHARMILA, G. et al. Chemopreventive effect of quercetin, a natural dietary flavonoid on prostate cancer in in vivo model. **Clin Nutr,** v. 33, n. 4, p. 718-26, Aug 2014. ISSN 1532-1983. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24080313</u> >.

SHIMA BIBI et al. Grape seed extract improves small intestinal health through suppressing inflammation and regulating alkaline phosphatase in IL-10-deficient mice. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 245-252, 2016.

SHUKLA, S. et al. Apigenin inhibits prostate cancer progression in TRAMP mice via targeting PI3K/Akt/FoxO pathway. **Carcinogenesis,** v. 35, n. 2, p. 452-60, Feb 2014. ISSN 1460-2180. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24067903</u> >.

_____. Oxidative Stress and Antioxidant Status in High-Risk Prostate Cancer Subjects. **Diagnostics (Basel)**, v. 10, n. 3, Feb 2020. ISSN 2075-4418. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32120827</u> >.

SILVA, R. S. et al. Steroidal hormone and morphological responses in the prostate anterior lobe in different cancer grades after Celecoxib and Goniothalamin treatments in TRAMP mice. **Cell Biol Int,** v. 42, n. 8, p. 1006-1020, Aug 2018. ISSN 1095-8355. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29603508</u> >.

SILVA, S. A. et al. Prostate hyperplasia caused by long-term obesity is characterized by high deposition of extracellular matrix and increased content of MMP-9 and VEGF. **Int J Exp Pathol**, v. 96, n. 1, p. 21-30, Feb 2015. ISSN 1365-2613. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25529509</u> >.

SINGHAL, S. S. et al. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 289, n. 3, p. 361-70, Dec 2015. ISSN 1096-0333. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26476300</u> >.

SINHA, A. A. et al. Immunohistochemical localization of laminin in the basement membranes of normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. **Prostate,** v. 15, n. 4, p. 299-313, 1989. ISSN 0270-4137. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2687824</u> >.

SKERENOVA, M. et al. Circulating tumor cells and serum levels of MMP-2, MMP-9 and VEGF as markers of the metastatic process in patients with high risk of metastatic progression. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 161, n. 3, p. 272-280, Sep 2017. ISSN 1213-8118. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28529342 >.

SLACK-DAVIS, J. K. et al. Differential requirement for focal adhesion kinase signaling in cancer progression in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. **Mol Cancer Ther,** v. 8, n. 8, p. 2470-7, Aug 2009. ISSN 1538-8514. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19671741</u> >.

SMITH, K. B.; SMITH, M. S. Obesity Statistics. **Prim Care**, v. 43, n. 1, p. 121-35, ix, Mar 2016. ISSN 1558-299X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26896205</u> >.

SOUSA-PINTO, B. et al. Characterization of TGF- β expression and signaling profile in the adipose tissue of rats fed with high-fat and energy-restricted diets. **J Nutr Biochem**, v. 38, p. 107-115, 12 2016. ISSN 1873-4847. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27736730</u> >.

SOUZA-MELLO, V. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. **World J Hepatol,** v. 7, n. 8, p. 1012-9, May 2015. ISSN 1948-5182. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26052390</u> >.

STARSÍCHOVÁ, A. et al. TGF-beta1 suppresses IL-6-induced STAT3 activation through regulation of Jak2 expression in prostate epithelial cells. **Cell Signal,** v. 22, n. 11, p. 1734-44, Nov 2010. ISSN 1873-3913. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20603212</u> >.

STROHMEYER, D. et al. Vascular endothelial growth factor and its correlation with angiogenesis and p53 expression in prostate cancer. **Prostate**, v. 45, n. 3, p. 216-24, Nov 2000. ISSN 0270-4137. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11074523</u> >.

SU, Y. et al. The evolutionally conserved activity of Dapper2 in antagonizing TGF-beta signaling. **FASEB J**, v. 21, n. 3, p. 682-90, Mar 2007. ISSN 1530-6860. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17197390</u> >.

SUBURU, J.; CHEN, Y. Q. Lipids and prostate cancer. **Prostaglandins Other Lipid Mediat,** v. 98, n. 1-2, p. 1-10, May 2012. ISSN 1098-8823. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22503963</u> >.

SUGIMURA, Y.; CUNHA, G. R.; DONJACOUR, A. A. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. **Biol Reprod,** v. 34, n. 5, p. 961-71, Jun 1986. ISSN 0006-3363. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3730488</u> >.

SUN, Y.; WANG, W.; TONG, Y. Berberine Inhibits Proliferative Ability of Breast Cancer Cells by Reducing Metadherin. **Med Sci Monit,** v. 25, p. 9058-9066, Nov 2019. ISSN 1643-3750. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31779025</u> >.

SUN, Y. et al. Berberine ameliorates fatty acid-induced oxidative stress in human hepatoma cells. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 11340, 09 2017. ISSN 2045-2322. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28900305</u> >.

SYED, D. N. et al. Dietary agents for chemoprevention of prostate cancer. **Cancer Lett,** v. 265, n. 2, p. 167-76, Jul 2008. ISSN 0304-3835. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18395333</u> >.

TAI, S. et al. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. **Prostate**, v. 71, n. 15, p. 1668-79, Nov 2011. ISSN 1097-0045. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21432867</u> >.

TAKEDA, H.; CHANG, C. Immunohistochemical and in-situ hybridization analysis of androgen receptor expression during the development of the mouse prostate gland. **J Endocrinol,** v. 129, n. 1, p. 83-9, Apr 1991. ISSN 0022-0795. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2030333</u> >.

TARAPORE, R. S.; SIDDIQUI, I. A.; MUKHTAR, H. Modulation of Wnt/β-catenin signaling pathway by bioactive food components. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 3, p. 483-91, Mar 2012. ISSN 1460-2180. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198211</u> >.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Adv Drug Deliv Rev,** v. 97, p. 4-27, Feb 2016. ISSN 1872-8294. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26562801</u> >.

THIRUPURASUNDARI, C. J.; PADMINI, R.; DEVARAJ, S. N. Effect of berberine on the antioxidant status, ultrastructural modifications and protein bound carbohydrates in azoxymethane-induced colon cancer in rats. **Chem Biol Interact,** v. 177, n. 3, p. 190-5, Feb 2009. ISSN 1872-7786. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18951886</u> >.

TIAN, Y. et al. Berberine inhibits androgen synthesis by interaction with aldo-keto reductase 1C3 in 22Rv1 prostate cancer cells. **Asian J Androl**, v. 18, n. 4, p. 607-12, 2016 Jul-Aug 2016. ISSN 1745-7262. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26698234</u> >.

TILLHON, M. et al. Berberine: new perspectives for old remedies. **Biochem Pharmacol**, v. 84, n. 10, p. 1260-7, Nov 2012. ISSN 1873-2968. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842630</u> >.

TINDALL, D. J.; RITTMASTER, R. S. The rationale for inhibiting 5alpha-reductase isoenzymes in the prevention and treatment of prostate cancer. **J Urol**, v. 179, n. 4, p. 1235-42, Apr 2008. ISSN 1527-3792. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18280514</u> >.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,** v. 25, n. 1, p. 16-27, Jan 2016. ISSN 1538-7755. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26667886</u> >.

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 7, p. 579-91, Jul 2009. ISSN 1474-1784. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19478820</u> >.

TRIPATHI, M. et al. Laminin-332 is a substrate for hepsin, a protease associated with prostate cancer progression. **J Biol Chem,** v. 283, n. 45, p. 30576-84, Nov 2008. ISSN 0021-9258. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18784072</u> >.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients,** v. 2, n. 12, p. 1231-46, Dec 2010. ISSN 2072-6643. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22254006</u> >.

TUCAKOVIC, L. et al. The e ff ects of anthocyanins on body weight and expression of adipocyte 's hormones: Leptin and adiponectin. **Journal of Functional Foods**, v. 45, p. 173-180, 2018.

TUDEK, B. et al. Lipid peroxidation in face of DNA damage, DNA repair and other cellular processes. **Free Radic Biol Med,** v. 107, p. 77-89, 06 2017. ISSN 1873-4596. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27908783</u> >.

TUXHORN, J. A. et al. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. **Clin Cancer Res,** v. 8, n. 9, p. 2912-23, Sep 2002. ISSN 1078-0432. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12231536</u> >.
_____. Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. **Cancer Res,** v. 62, n. 11, p. 3298-307, Jun 2002. ISSN 0008-5472. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12036948</u> >.

_____. Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. **Cancer Res,** v. 62, n. 21, p. 6021-5, Nov 2002. ISSN 0008-5472. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414622</u> >.

UEHARA, H. et al. Adipose tissue:Critical contributor to the development of prostate cancer. **J Med Invest**, v. 65, n. 1.2, p. 9-17, 2018. ISSN 1349-6867. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29593201</u> >.

VAICIK, M. K. et al. Laminin α 4 deficient mice exhibit decreased capacity for adipose tissue expansion and weight gain. **PLoS One,** v. 9, n. 10, p. e109854, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25310607</u> >.

VAN DER HEIJDEN, R. A. et al. Effects of Anthocyanin and Flavanol Compounds on Lipid Metabolism and Adipose Tissue Associated Systemic Inflammation in Diet-Induced Obesity. **Mediators Inflamm,** v. 2016, p. 2042107, 2016. ISSN 1466-1861. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27365896</u> >.

VENKATESWARAN, V. et al. Antioxidants block prostate cancer in lady transgenic mice. **Cancer Res,** v. 64, n. 16, p. 5891-6, Aug 2004. ISSN 0008-5472. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15313934</u> >.

VERMEULEN, A.; RUBENS, R.; VERDONCK, L. Testosterone secretion and metabolism in male senescence. J Clin Endocrinol Metab, v. 34, n. 4, p. 730-5, Apr 1972. ISSN 0021-972X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5012774</u> >.

VOELLER, H. J.; TRUICA, C. I.; GELMANN, E. P. Beta-catenin mutations in human prostate cancer. **Cancer Res,** v. 58, n. 12, p. 2520-3, Jun 1998. ISSN 0008-5472. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9635571</u> >.

VUDDANDA, P. R.; CHAKRABORTY, S.; SINGH, S. Berberine: a potential phytochemical with multispectrum therapeutic activities. **Expert Opin Investig Drugs,** v. 19, n. 10, p. 1297-307, Oct 2010. ISSN 1744-7658. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20836620</u> >.

WAN, L. et al. Genetic ablation of metadherin inhibits autochthonous prostate cancer progression and metastasis. **Cancer Res,** v. 74, n. 18, p. 5336-47, Sep 2014. ISSN 1538-7445. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25074613</u> >.

WANG, B. et al. Resveratrol prevents suppression of regulatory T-cell production, oxidative stress, and inflammation of mice prone or resistant to high-fat diet-induced obesity. **Nutr Res,** v. 33, n. 11, p. 971-81, Nov 2013. ISSN 1879-0739. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24176237</u> >.

_____. Targeting Wnt/β-Catenin Signaling for Cancer Immunotherapy. **Trends Pharmacol Sci**, v. 39, n. 7, p. 648-658, 07 2018. ISSN 1873-3735. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29678298</u> >.

WANG, G. et al. Genetics and biology of prostate cancer. **Genes Dev**, v. 32, n. 17-18, p. 1105-1140, 09 2018. ISSN 1549-5477. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30181359</u> >.

WANG, J. L. et al. TGF- β signaling regulates DACT1 expression in intestinal epithelial cells. **Biomed Pharmacother**, v. 97, p. 864-869, Jan 2018. ISSN 1950-6007. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29136762</u> >.

WANG, L. et al. Berberine alleviates adipose tissue fibrosis by inducing AMP-activated kinase signaling in high-fat diet-induced obese mice. **Biomed Pharmacother**, v. 105, p. 121-129, Sep 2018. ISSN 1950-6007. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29852389</u> >.

WANG, W. H. et al. Evaluation of the antioxidant activity and antiproliferative effect of the jaboticaba (Myrciaria cauliflora) seed extracts in oral carcinoma cells. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 185946, 2014. ISSN 2314-6141. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25197631</u> >.

WANG, Y. et al. Hypoglycemic and insulin-sensitizing effects of berberine in high-fat diet- and streptozotocin-induced diabetic rats. **Metabolism,** v. 60, n. 2, p. 298-305, Feb 2011. ISSN 1532-8600. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20304443</u> >.

_____. The Anti-Cancer Mechanisms of Berberine: A Review. **Cancer Manag Res**, v. 12, p. 695-702, 2020. ISSN 1179-1322. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32099466</u> >.

WARNER FINSTAD et al. Prevalence of overweight and prediabetes in men receiving systemic therapies for metastatic prostate cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36 : 6_suppl p. 289-289, 2018.

WEN, J. et al. Loss of Dact1 disrupts planar cell polarity signaling by altering dishevelled activity and leads to posterior malformation in mice. **J Biol Chem,** v. 285, n. 14, p. 11023-30, Apr 2010. ISSN 1083-351X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20145239</u> >.

WEN, S. et al. Stromal androgen receptor roles in the development of normal prostate, benign prostate hyperplasia, and prostate cancer. **Am J Pathol**, v. 185, n. 2, p. 293-301, Feb 2015. ISSN 1525-2191. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25432062</u> >.

WINTERBOURN, C. C. et al. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. **J Lab Clin Med,** v. 85, n. 2, p. 337-41, Feb 1975. ISSN 0022-2143. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/803541</u> >.

WONG, L. et al. Prostate angiogenesis in development and inflammation. **Prostate**, v. 74, n. 4, p. 346-58, Apr 2014. ISSN 1097-0045. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24293357</u> >.

WU, Z. S. et al. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. Int J Cancer, v. 122, n. 9, p. 2050-6, May 2008. ISSN 1097-0215. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18172859 >.

XIE, H. et al. Infiltrated pre-adipocytes increase prostate cancer metastasis via modulation of the miR-301a/androgen receptor (AR)/TGF- β 1/Smad/MMP9 signals. **Oncotarget**, v. 6, n. 14, p. 12326-39, May 2015. ISSN 1949-2553. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25940439</u> >.

XIE, J. et al. Berberine-induced apoptosis in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species generation and mitochondrial-related apoptotic pathway. **Tumour Biol,** v. 36, n. 2, p. 1279-88, Feb 2015. ISSN 1423-0380. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352028</u> >.

XIONG, P. et al. The effect of berberine supplementation on obesity indices: A dose- response meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials. **Complement Ther Clin Pract**, v. 39, p. 101113, May 2020. ISSN 1873-6947. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32379652</u> >.

XU, H.; JIANG, H. W.; DING, Q. Insulin-Like growth factor 1 related pathways and high-fat diet promotion of transgenic adenocarcinoma mouse prostate (TRAMP) cancer progression. **Actas Urol Esp,** v. 39, n. 3, p. 161-8, Apr 2015. ISSN 1699-7980. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25442907</u> >.

YANG, F. et al. Downregulated expression of hepatoma-derived growth factor inhibits migration and invasion of prostate cancer cells by suppressing epithelial-mesenchymal transition and MMP2, MMP9. **PLoS One,** v. 13, n. 1, p. e0190725, 2018. ISSN 1932-6203. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29300772</u> >.

YANG, J. et al. Increased expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-C and VEGF receptor-3 in prostate cancer tissue are associated with tumor progression. Asian J Androl, v. 8, n. 2, p. 169-75, Mar 2006. ISSN 1008-682X. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16491267</u> >.

YANG, J. H.; LIN, L. K.; ZHANG, S. Effects of DACT1 methylation status on invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma. **Biol Res,** v. 52, n. 1, p. 31, Jun 2019. ISSN 0717-6287. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31182157</u> >.

YIN, X. et al. DACT1, an antagonist to Wnt/ β -catenin signaling, suppresses tumor cell growth and is frequently silenced in breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 15, n. 2, p. R23, 2013. ISSN 1465-542X. Available at: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23497530</u> >.

YOUN, D. H. et al. Berberine Improves Benign Prostatic Hyperplasia via Suppression of 5 Alpha Reductase and Extracellular Signal-Regulated Kinase. **Front Pharmacol**, v. 9, p. 773, 2018. ISSN 1663-9812. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30061836</u> >.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. Arch Biochem Biophys, v. 385, n. 1, p. 20-7, Jan 2001. ISSN 0003-9861. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11361018</u> >.

YUAN, G. et al. Oncogenic function of DACT1 in colon cancer through the regulation of β -catenin. **PLoS One,** v. 7, n. 3, p. e34004, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22470507</u> >.

ZADRA, G.; PHOTOPOULOS, C.; LODA, M. The fat side of prostate cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1831, n. 10, p. 1518-32, Oct 2013. ISSN 0006-3002. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23562839</u> >.

ZAR, J. H. Biostatistical Analysis. New Jersey, USA: 1999.

ZHANG, N. et al. Berberine decreases insulin resistance in a PCOS rats by improving GLUT4: Dual regulation of the PI3K/AKT and MAPK pathways. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 110, p. 104544, Feb 2020. ISSN 1096-0295. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31778716</u> >.

ZHANG, Q. et al. Berberine represses human gastric cancer cell growth in vitro and in vivo by inducing cytostatic autophagy via inhibition of MAPK/mTOR/p70S6K and Akt signaling pathways. **Biomed Pharmacother,** v. 128, p. 110245, Aug 2020. ISSN 1950-6007. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32454290</u> >.

_____. Berberine inhibits the expression of hypoxia induction factor-1alpha and increases the radiosensitivity of prostate cancer. **Diagn Pathol,** v. 9, p. 98, May 2014. ISSN 1746-1596. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24886405</u> >.

ZHANG, X. et al. Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats. **Sci Rep,** v. 5, p. 14405, Sep 2015. ISSN 2045-2322. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26396057</u> >.

_____. Structural changes of gut microbiota during berberine-mediated prevention of obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed rats. **PLoS One,** v. 7, n. 8, p. e42529, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22880019</u> >.

ZHANG, Y.; WEINBERG, R. A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. **Front Med,** v. 12, n. 4, p. 361-373, Aug 2018. ISSN 2095-0225. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30043221</u> >.

ZHAO, D. K. et al. Jaboticabin and Related Polyphenols from Jaboticaba (Myrciaria cauliflora) with Antiinflammatory Activity for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **J Agric Food Chem,** v. 67, n. 5, p. 1513-1520, Feb 2019. ISSN 1520-5118. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30675793</u> >.

ZHONG, H.; YIN, H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: focusing on mitochondria. **Redox Biol,** v. 4, p. 193-9, 2015. ISSN 2213-2317. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25598486</u> >.

ZHONG, W. D. et al. CD147, MMP-1, MMP-2 and MMP-9 protein expression as significant prognostic factors in human prostate cancer. **Oncology**, v. 75, n. 3-4, p. 230-6, 2008. ISSN 1423-0232. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852494</u> >.

ZHOU, J. Y. et al. Chronic effects of berberine on blood, liver glucolipid metabolism and liver PPARs expression in diabetic hyperlipidemic rats. **Biol Pharm Bull,** v. 31, n. 6, p. 1169-76, Jun 2008. ISSN 0918-6158. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18520050</u> >.

ZHOU, Y. et al. Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. **Nutrients**, v. 8, n. 8, Aug 2016. ISSN 2072-6643. Available at: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27556486</u> >.

8. MATERIAIS ANEXOS COMPLEMENTARES



Figura 28: Análise qualitativa do efeito do DMSO nos grupos controles da berberina (n = 3 por grupo). a) TRAMP com 16 semanas de idades submetido a dieta normolipídica. b) TRAMP com 16 semanas de idades submetido a dieta normolipídica e tratado com DMSO. c) TRAMP com 16 semanas de idades submetido a dieta hiperlipídica. d) TRAMP com 16 semanas de idades submetido a dieta hiperlipídica. d) TRAMP com 16 semanas de idades submetido a dieta hiperlipídica.

Autores	Dosagem	Administração	Linhagem	Duração	Alteração de peso
Youn et al. 2018	20 mg/kg	Inguinal	Sprague–Dawley	4 semanas	Não
			(com indução de	diariamente	
			hiperplasia benigna)		
Zhang et al. 2014	5mg/kg ou	Intraperitoneal	Camundongo xenográfico	6 doses	Não
	10 mg/kg		BALB/c		
Li et al. 2011	5mg/kg	Intraperitoneal	Camundongo xenográfico	15 dias	Não
			Nu/nu	diariamente	
Choi et al. 2009	5mg/kg ou	Intraperitoneal	Camundongo xenográfico	4 semanas	Não
	10 mg/kg		BALB/c	2	
				vezes/sema	
				na	

Tabela 3: Relação do tratamento do PCa com a berberina e alteração de peso

Tabela 4: Relação do tratamento com a berberina e redução do ganho de peso em linhagens de roedores submetidas à dieta hiperlipídica.

Autores	Dosagem	Administração	Linhagem	Duração	Redução do ganho de peso	Redução da ingestão calórica
Zhang et al 2015	100 mg/kg ou 200 mg/kg	Oral	Wistar	8 semanas	Sim	Não
Leng et al. 2004	187,5 mg/kg ou 562,5 mg/kg	Intragástrica	Wistar	4 semanas	Sim	Sim
Hu e Davies 2010	3 mg/kg	Intraperitoneal	C57BL/6J	36 dias	Sim	Sim
Zhang et al. 2012	100 mg/kg	Oral	Wistar	18 semanas	Sim	Sim
Wang et al. 2018	75 mg/kg/d ou 150 mg/kg/d	Oral	C57BL/6J	4 semanas	Apenas na Dosagem Mais alta	Não

9. APÊNDICES E ANEXOS

9.1 CERTIFICADO CEUA





CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada <u>Efeito do tratamento com o extrato da casca da Jabuticaba e/ou</u> <u>SU5416 no microambiente do adenocarcinoma de próstata em camundongos (TRAMP) associado ou</u> <u>não aos efeitos pró-tumorigênicos da dieta hiperlipidica</u>, registrada com o nº <u>4323-1</u>, sob a responsabilidade de <u>Profa, Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete e Ellen Nogueira Pangrazi</u>, 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 <u>24 de agosto</u> <u>de 2016</u>.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica				
Vigência do projeto:	24/08/2016-24/08/2020				
Vigência da autorização para manipulação animal:	24/08/2016-24/08/2020				
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico Linhagem: C57BL/6/- Tg(TRAMP)8247Ng/J				
No. de animais:	200				
Peso / Idade:	16 semanas / 25g				
Sexo:	machos				
Origem:	CEMIB/UNICAMP				
	Charles In Freedom and Contraction Contraction of				

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 24 de agosto de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud Presidente

Fátima Alonso Secretária Executiva

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





Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Efeito do tratamento com o extrato da casca da Jabuticaba e/ou SU5416 no microambiente do adenocarcinoma de próstata em camundongos (TRAMP) associado ou não aos efeitos pró-tumorigênicos da dieta hiperlipídica". (protocolo CEUA/UNICAMP nº 4323-1), de responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete e da aluna Ellen Nogueira Pangrazi, teve o título alterado para "Resposta do microambiente do adenocarcinoma de próstata em camundongos TRAMP ao tratamento com extrato da casca da jabuticaba ou berberina, associado ao efeito pró-tumorigênico da dieta hiperlipídica".

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 24/08/2016.

Campinas, 11 de dezembro de 2019.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro Presidente da CEUA/UNICAMP

Rosangela dos Santos Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/

9.2 Declaração de direito autoral

Declaro que a presente tese não infrigiu os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.