

## EFEITOS DO EXTRATO DA CASCA DE JABUTICABA (*MYRCIARIA JABOTICABA*) SOBRE A PROGRESSÃO DE LESÕES RESISTENTES À CASTRAÇÃO EM CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS PARA O CÂNCER DE PRÓSTATA (TRAMP)

Palavras-Chave: CÂNCER DE PRÓSTATA, JABUTICABA, TRAMP

Autores:

ANA CLARA TROVÓ VECCHI, IB – UNICAMP

BIANCA BARBOSA REZENDE, IB - UNICAMP

Prof. Dr. MÁRIO ROBERTO MARÓSTICA, FEA - UNICAMP

Profa. Dra. VALÉRIA HELENA ALVES CAGNON, IB - UNICAMP

Prof. Dr. FABIO MONTICO (orientador), IB - UNICAMP

### INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) destaca-se por sua alta incidência, sendo o segundo mais frequente nos homens brasileiros, atrás apenas do câncer de pele não-melanoma. Estima-se que, somente no Brasil, aproximadamente 72 mil novos casos de CaP serão diagnosticados a cada ano do próximo triênio, cerca de 35% dos quais certamente irão evoluir para o fenótipo resistente à castração, metastático e letal (CHENG et al., 2019; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2022).

Devido aos altos riscos do CaP para os pacientes afetados, busca-se encontrar tratamentos efetivos para lidar com o quadro clínico e retardar o agravamento deste. Nessa busca, diversos compostos naturais capazes de intervir nos processos nocivos do câncer vêm sendo estudados e colocados em teste. Dentre esses compostos, encontra-se o extrato obtido a partir da casca da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) (ECJ) (LAMAS et al. 2020). Sabe-se que os compostos fenólicos de diversos vegetais, assim como os da jabuticaba, apresentam características anticancerígenas promissoras, principalmente devido às suas ações anti-inflamatórias e antioxidantes, uma vez que tanto o estresse oxidativo quanto a inflamação são processos capazes de causar e agravar diversos tipos de câncer, incluindo o de próstata (LAMAS et al., 2020; MOTTAGHIPESHEH et al., 2022). Além disso, estudos anteriores *in vivo* já indicaram a possível eficiência do ECJ em prevenir a progressão de lesões prostáticas associadas à senescência, as quais podem culminar no CaP. Assim, de acordo com LAMAS et al., 2020, o tratamento com esse extrato fez com que os tecidos prostáticos de camundongos senis apresentassem maior incidência de epitélio saudável em relação ao observado em animais não tratados. Tais resultados promissores despertam a atenção para a realização de mais estudos e testes, analisando a atuação do extrato em diferentes cenários, como no caso do câncer resistente à castração e metastático.

Para isso, nesse estudo foram utilizados como modelo experimental os camundongos transgênicos para adenocarcinoma de próstata (na sigla em inglês, *Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate* - TRAMP). Esse modelo se destaca pela semelhança com humanos em termos de desenvolvimento do tumor em estágios e responsividade a andrógenos. Dessa forma, uma das características relevantes para o uso de camundongos TRAMP é que, de forma semelhante à doença humana, o CaP regride com a privação de andrógenos em grande porcentagem dos casos, mas volta a ocorrer de forma agressiva após certo tempo, tornando-se independentemente da ação hormonal (HURWITZ et al., 2001; GINGRICH et al., 1999). Assim, o objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito do ECJ sobre a progressão do adenocarcinoma prostático andrógeno-independente no lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP.

### METODOLOGIA

#### • Animais e procedimento experimental

No presente trabalho foram utilizados 24 camundongos machos transgênicos da linhagem TRAMP (C57BL/6-Tg(TRAMP)8247Ng/J X FVB/NJ)F1/J). O Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) forneceu o número de animais previsto para o estudo e estes foram mantidos no biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional (Área de Anatomia) do Instituto de Biologia. Ao atingirem a idade para o início do tratamento, somente animais sem tumores palpáveis foram eleitos para integrar o estudo, sendo então divididos nos seguintes grupos experimentais:

**a) Grupo TRAMP Controle (TRCON):** camundongos TRAMP com 16 semanas de idade (n=6) foram submetidos à simulação da castração cirúrgica, com abertura do escroto sem retirada dos testículos e, após 48 horas, foram subdivididos em dois subgrupos de 3 animais. Durante 6 semanas, cada subgrupo recebeu água filtrada (veículo do ECJ) ou o veículo de diluição da flutamida por via oral, cinco vezes por semana;

**b) Grupo TRAMP Jabuticaba (TRCONJAB):** camundongos TRAMP com 16 semanas de idade (n=6) foram submetidos à simulação da castração cirúrgica e, após 48 horas, receberam 5,8 g/kg de ECJ por via oral, cinco vezes por semana, durante 6 semanas (modificado de LAMAS et al., 2018 e de NOGUEIRA-LIMA et al., 2019). O método utilizado para preparar o ECJ foi patenteado e licenciado em parceria com o Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Jr., responsável pelo Laboratório de Nutrição e Metabolismo (FEA-UNICAMP), conforme descrito em MARÓSTICA et al. (2017) e LAMAS et al. (2018). A caracterização detalhada dos compostos bioativos presentes no ECJ e de sua atividade antioxidante *in vitro*, bem como a definição da dose a ser administrada *in vivo*, foram realizadas em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (LAMAS et al., 2018);

**c) Grupo TRAMP Castrado + Flutamida (TRFLU):** camundongos TRAMP com 16 semanas de idade (n=6) foram submetidos à castração cirúrgica, com retirada bilateral dos testículos, e, após 48 horas, também foram submetidos à castração química por meio da administração por via oral de 33 mg/kg de Flutamida (Blau Farmacêutica S.A., Cotia, SP, Brasil) diluída em carboximetilcelulose 0,5%, cinco vezes por semana, durante 6 semanas (modificado de ZHANG et al., 1999; de RAGHOW et al., 2000 e de CHO et al., 2007);

**d) Grupo TRAMP Castrado + Flutamida + Jabuticaba (TRFLUJAB):** camundongos TRAMP com 16 semanas de idade (n=6) receberam tratamento com protocolo similar ao do grupo TRFLU bem como 5,8 g/kg de ECJ por via oral, cinco vezes por semana, durante 6 semanas.

Os animais dos grupos experimentais receberam água e a mesma dieta sólida *ad libitum* (Nuvilab). Após 6 semanas de tratamento, todos os animais foram pesados, anestesiados e eutanasiados. Amostras do lobo anterior da próstata foram coletadas de todos os animais de cada grupo experimental e submetidas às análises de microscopia de luz e imunohistoquímica.

• **Análise histopatológica do tecido prostático**

As amostras prostáticas coletadas foram fixadas em solução de Bouin e submetidas aos procedimentos de rotina para inclusão em parafina e polímeros plásticos, com subsequente microtomia e confecção de lâminas histológicas. As secções teciduais obtidas foram coradas em Hematoxilina-Eosina e submetidas a análise histopatológica. O diagnóstico das lesões prostáticas foi baseado em critérios morfológicos de acordo com **GINGRICH et al. (1999)** e **BERMAN-BOOTY et al. (2012)**. Para a análise, dez campos aleatórios sob aumento de 400X foram fotografados por animal e divididos em quadrantes. Em cada quadrante, o tecido prostático foi categorizado de acordo com a incidência focal dos seguintes aspectos morfológicos epiteliais: 0) Atrofia epitelial (AE); 1) Epitélio saudável (ES); 2) Neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau (LGNIP); 3) Neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (HGNIPI); e 4) Adenocarcinoma bem diferenciado (CPBD) (Fig. 1).

• **Imunohistoquímica**

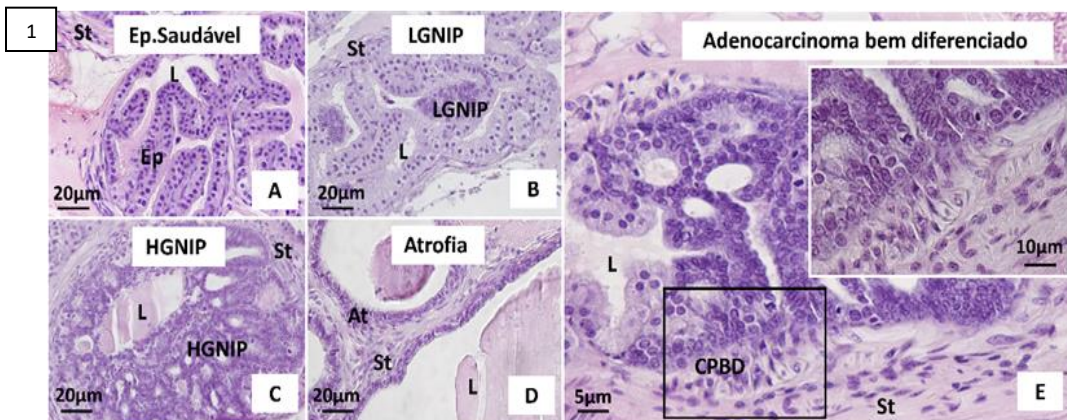
Amostras prostáticas dos mesmos animais utilizados para a análise histopatológica foram utilizadas para as imunomarcações, sendo as secções teciduais coletadas em lâminas silanizadas. Após os procedimentos de recuperação antigênica, bloqueio das peroxidases endógenas e das interações inespecíficas entre proteínas, os cortes foram incubados com os anticorpos primários *mouse* monoclonal anti-PCNA (Abcam, ab29) e *rabbit* policlonal anti-AR (Abcam, ab74272) para detecção imunohistoquímica do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e do Receptor de Andrógeno (AR). Após incubação com os anticorpos secundários e revelação da reação com solução cromogênica de diaminobenzidina (DAB), os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Harris, montados e fotografados. As secções prostáticas foram avaliadas através do precipitado acastanhado de DAB, que indica a imunorreatividade do anticorpo. A distribuição da imunorreatividade do antígeno foi determinada a partir de 10 campos aleatoriamente fotografados sob aumento de 400X em cada animal, sendo que a quantificação da reatividade se baseou em um sistema de contagem de pontos envolvendo a aplicação de uma grade com 850 intersecções ao campo microscópico (**WEIBEL, 1963**). O número de intersecções da grade com positividade para o antígeno foi contabilizado e expresso em porcentagem em relação ao total.

• **Análise estatística**

Os parâmetros quantificados na avaliação da incidência de lesões e na avaliação imunohistoquímica foram analisados estatisticamente para os diferentes grupos. A análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey foi utilizada para comparação entre médias de dados paramétricos, ao passo que valores com distribuição não paramétrica foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. A comparação entre as proporções dos diversos parâmetros morfológicos epiteliais nos grupos experimentais foram analisadas pelo teste ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5% e expressas como média ± desvio padrão (**MONTGOMERY, 1991; ZAR, 1999**).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

Os resultados parciais obtidos até o presente momento apresentam dados acerca da resposta da glândula de coagulação de camundongos TRAMP frente aos cenários de: 1- privação hormonal, abordagem comumente utilizada para o tratamento do CaP (**GOLDSPIEL; KOHLER, 1990**); 2- administração de extrato da casca de jabuticaba (ECJ), composto natural de baixa toxicidade com efeitos quimiopreventivos promissores na literatura (**LAMAS et al., 2018, 2020a, 2020b**); e 3- associação dessas duas terapias. De maneira geral, os presentes resultados demonstraram que nem a depleção hormonal e nem a administração do ECJ, aplicados isoladamente ou em combinação, foram capazes de afetar positivamente a progressão do CaP na glândula de coagulação de camundongos TRAMP em relação aos animais controle. Pelo contrário, a ablação androgênica resultou em marcante efeito negativo sobre a carcinogênese na glândula de coagulação, sendo que as diferenças mais significativas entre os grupos experimentais foram



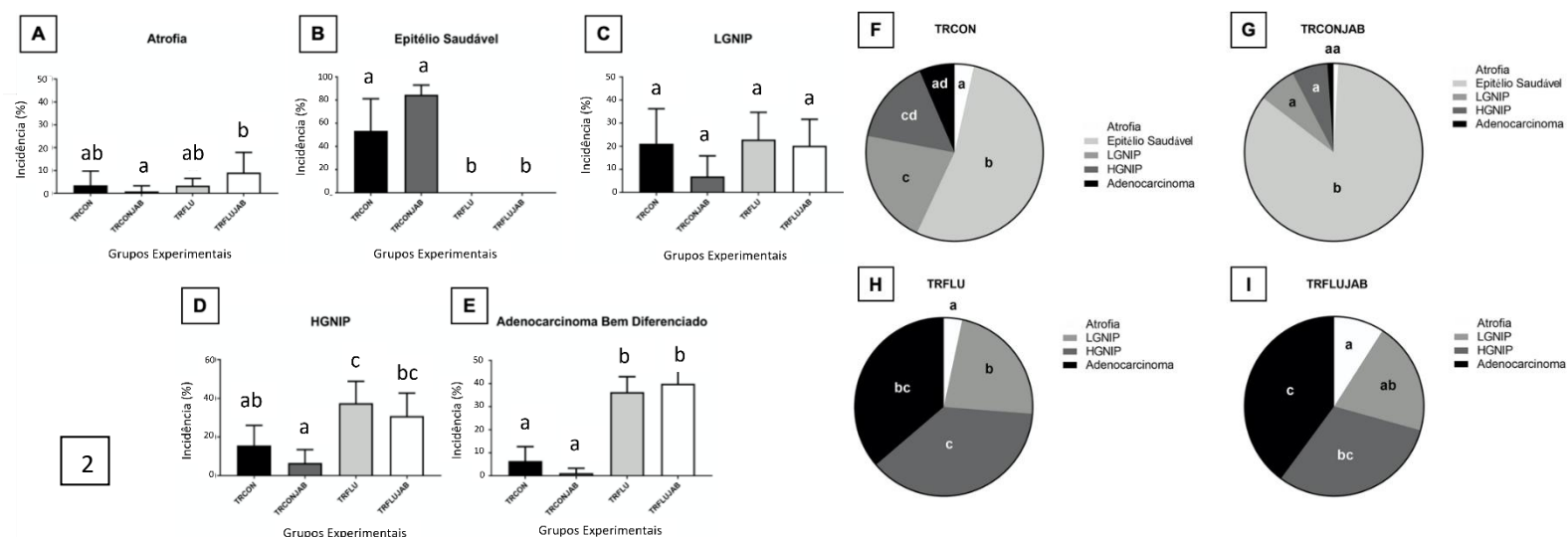
**Figura 1.** Fotomicrografias dos parâmetros morfológicos do epitélio prostático utilizados na análise histopatológica da glândula de coagulação dos grupos experimentais. **A)** Atrofia epitelial (AE); **B)** Epitélio saudável (ES); **C)** Neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau (LGNIP); **D)** Neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (HGNIPI); **E)** Adenocarcinoma bem diferenciado (CPBD), caracterizado por invasão de células epiteliais em direção ao estroma prostático (cabeças de setas pretas). Ep: Epitélio; L: Lúmen; St: Estroma.

decorrentes da realização ou não de castração cirúrgica e química. Nesse sentido, enquanto TRCON e TRCONJAB apresentaram maior incidência de epitélio saudável em relação a TRFLU e TRFLUJAB (Figs. 2B, 2F-2I; Tabela 1), estes grupos caracterizaram-se por completa ausência desse parâmetro morfológico no tecido prostático, além de significativo incremento na frequência de lesões malignas e/ou pré-malignas de alto grau, indicando aceleração da progressão tumoral para o fenótipo resistente à castração (Figs. 2D-2I; Tabela 1). Paralelamente, o estroma prostático demonstrou nítidas alterações após a ablação androgênica, com hipertrofia e hiperplasia dos componentes fibrilares e celulares da camada periacinar, achados que foram acompanhados por significativo incremento na frequência

de positividade do marcador de proliferação celular PCNA em ambos os compartimentos glandulares dos grupos TRFLU e TRFLUJAB (Figs. 3C, 3D, 4A e 4B; Tabela 2).

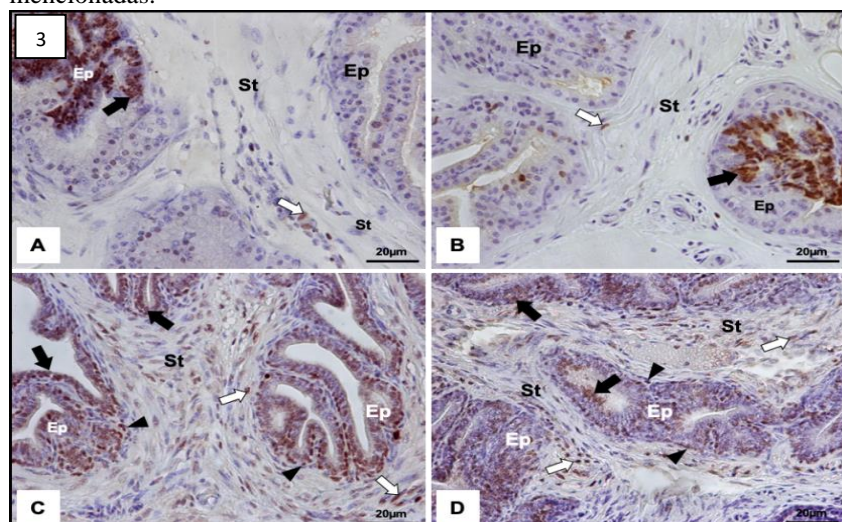
Grupos	Parâmetros Morfológicos				
	Atrofia epitelial	Epitélio saudável	LGNI	HGNI	CP
TRCON	3,54 ± 6,27 <sup>ab</sup>	53,44 ± 27,71 <sup>a</sup>	21,02 ± 15,21 <sup>a</sup>	15,55 ± 10,42 <sup>ab</sup>	6,45 ± 6,21 <sup>a</sup>
TRCONJAB	0,86 ± 2,44 <sup>a</sup>	84,61 ± 8,30 <sup>a</sup>	6,90 ± 8,92 <sup>a</sup>	6,50 ± 6,96 <sup>a</sup>	1,13 ± 2,16 <sup>a</sup>
TRFLU	3,36 ± 3,20 <sup>ab</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	22,88 ± 11,79 <sup>a</sup>	37,52 ± 11,30 <sup>c</sup>	36,25 ± 6,70 <sup>b</sup>
TRFLUJAB	9,07 ± 8,87 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	20,24 ± 11,42 <sup>a</sup>	30,81 ± 11,90 <sup>bc</sup>	39,89 ± 7,34 <sup>b</sup>

**Tabela 1.** Distribuição das incidências dos diferentes parâmetros morfológicos do epitélio secretor na glândula de coagulação de camundongos TRAMP dos grupos experimentais. Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre dois grupos experimentais (P<0,05).

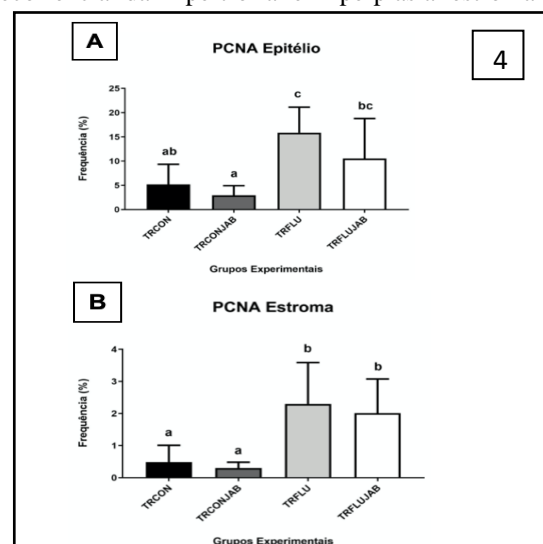


**Figura 2.** Gráficos de incidência dos diferentes parâmetros morfológicos epiteliais (Atrofia epitelial - AE; Epitélio saudável - ES; Neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau - LGNI; Neoplasia intraepitelial prostática de alto grau - HGNI; e Adenocarcinoma prostático bem diferenciado - CPBD) na glândula de coagulação de camundongos TRAMP. Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre dois grupos experimentais (P<0,05)

Ainda, os resultados demonstraram que a ablação hormonal teve efeito marcante sobre a reatividade do AR no citoplasma das células estromais, as quais exibiram acréscimo significativo na frequência de positividade desse receptor (Figs. 5C, 5D, 6B; Tabela 3), provavelmente refletindo a elevação da expressão proteica do mesmo em decorrência da hipertrofia e hiperplasia estromais mencionadas.



**Figura 3.** Fotomicrografias de imunohistoquímica para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) na glândula de coagulação dos grupos experimentais. A) Grupo TRCON; B) Grupo TRCONJAB; C) Grupo TRFLU; D) Grupo TRFLUJAB. Setas pretas, cabeças de setas pretas e setas brancas indicam, respectivamente, positividade em células epiteliais luminiais, células basais e células estromais. Ep: Epitélio; L: Lúmen; St: Estroma.



**Figura 4.** Gráficos demonstrando a frequência de positividade para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) nos compartimentos epitelial (A) e estromal (B) da glândula de coagulação de camundongos TRAMP. Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre dois grupos experimentais (P<0,05).

Em relação ao ECJ, à primeira vista, os resultados demonstraram que a administração do extrato, na dose e período de tratamento aplicados, não se demonstrou eficaz em interromper e/ou desacelerar a progressão tumoral na glândula de coagulação do modelo

TRAMP, haja vista que nenhum dos aspectos morfológicos epiteliais analisados diferiu significativamente nos grupos que receberam o ECJ (TRCONJAB e TRFLUJAB) em relação aos respectivos controles (TRCON e TRFLU). Nesse sentido, tais achados contrastam com registros prévios da literatura demonstrando o potencial quimiopreventivo do ECJ sobre a progressão de lesões proliferativas

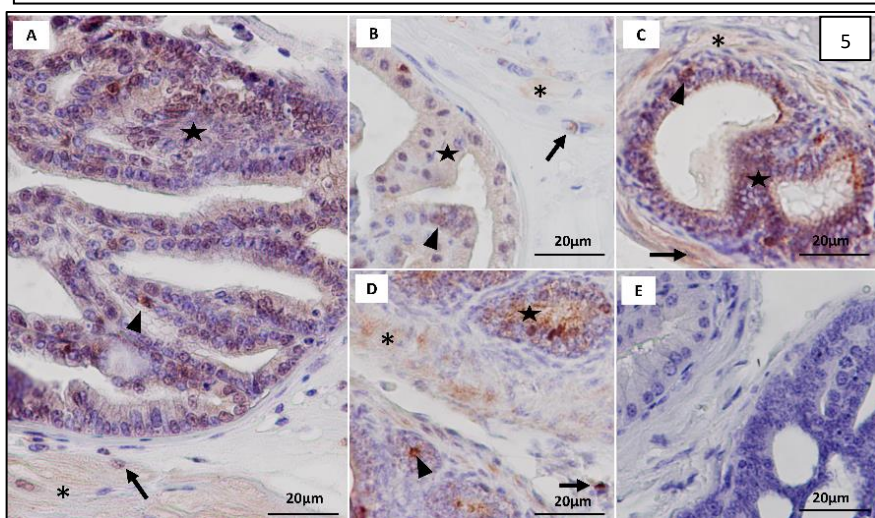
Compartimento glandular	Grupos Experimentais			
	TRCON	TRCONJAB	TRFLU	TRFLUJAB
<b>Epitélio</b>	5,18 ± 4,17 <sup>a</sup>	2,92 ± 1,99 <sup>a</sup>	15,86 ± 5,27 <sup>c</sup>	10,52 ± 8,27 <sup>bc</sup>
<b>Estroma</b>	0,49 ± 0,52 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,18 <sup>a</sup>	2,30 ± 1,28 <sup>b</sup>	2,01 ± 1,06 <sup>b</sup>

**Tabela 2.** Porcentagens de imunolocalização epitelial antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) nos compartimentos epitelial e estromal da glândula de coagulação dos grupos experimentais. Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre dois grupos experimentais (P<0,05).

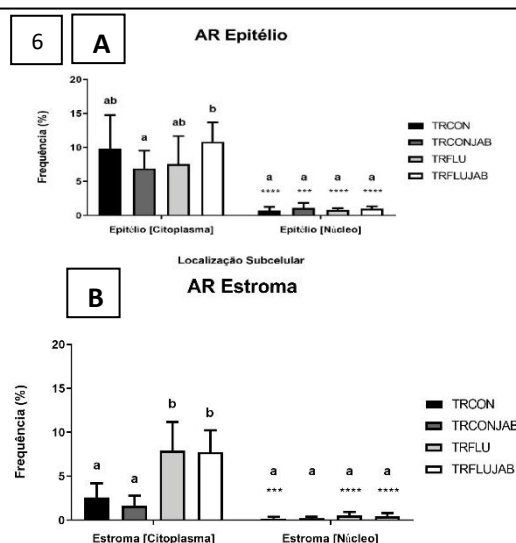
prostáticas (LAMAS et al., 2020a, 2020b). Apesar disso, um aspecto importante a ser considerado é que, enquanto esses autores investigaram a ação do ECJ no microambiente prostático de camundongos senis, não-transgênicos para o adenocarcinoma de próstata, o presente estudo propôs, de maneira inédita, a avaliação desses efeitos durante a progressão do CaP no modelo TRAMP, no qual a tumorigênese prostática ocorre de forma autóctone e intrínseca (GINGRICH et al., 1999; KAPLAN-LEFKO et al., 2003). Mais ainda, este estudo objetivou a investigação do potencial quimiopreventivo do ECJ em um cenário de resistência à castração, simulando o CaP humano avançado e resistente à ablação androgênica por meio da castração cirúrgica e química dos animais experimentais. Nesse sentido, KIDO et al. (2022) verificaram que o ECJ atuou de forma mais eficaz na redução da viabilidade e da expressão de mediadores inflamatórios em células tumorais prostáticas sensíveis a andrógenos (LNCaP) quando comparadas a uma linhagem mais agressiva e independente desses hormônios (PC-3). Em concordância, estudos no CaP *in vitro* com polifenóis como o resveratrol e o ácido gálico, este último também presente no ECJ, revelaram os efeitos quimiopreventivos promissores desses compostos sobre células LNCaP quando associados à flutamida, com a qual demonstraram efeitos sinérgicos ou aditivos, inclusive sobre a expressão do AR, reforçando a importância do *status* de dependência androgênica do CaP para que sejam observadas respostas citotóxicas efetivas frente ao tratamento com esses compostos bioativos (KAI; LEVENSON, 2011; RUSSELL JR et al., 2011). Assim, no cenário de depleção hormonal do presente estudo, a ausência de diferenças significativas nos padrões de imunolocalização do AR frente à administração do ECJ (Figs. 5C, 5D, 6A, 6B; Tabela 3) sugere maior agressividade e menor dependência androgênica das lesões observadas, com possível ativação de vias de sinalização mediadas por outros hormônios, como os estrógenos. Tal hipótese encontra apoio na manutenção de frequências similares para a reatividade nuclear do AR em todos os grupos experimentais, bem como na semelhança entre a morfologia prostática nos grupos TRFLU e TRFLUJAB e os registros da literatura frente à exposição estrogênica (BIANCO et al., 2002; RISBRIDGER et al., 2001).

Compartimento glandular	Grupos Experimentais (Citoplasma)				Grupos Experimentais (Núcleo)			
	TRCON	TRCON JAB	TRFLU	TRFLU JAB	TRCON	TRCON JAB	TRFLU	TRFLUJAB
<b>Epitélio</b>	9,82± 4,93 <sup>ab</sup>	6,91± 2,62 <sup>a</sup>	7,58± 4,10 <sup>ab</sup>	10,85± 2,84 <sup>b</sup>	0,70± 0,56 <sup>a</sup>	1,11± 0,74 <sup>a</sup>	7,58± 0,28 <sup>b</sup>	10,85± 0,35 <sup>b</sup>
<b>Estroma</b>	2,59± 1,63 <sup>a</sup>	1,66± 1,12 <sup>a</sup>	7,90± 3,30 <sup>a</sup>	7,75± 2,48 <sup>a</sup>	0,20± 0,18 <sup>a</sup>	0,21± 0,19 <sup>a</sup>	0,54± 0,41 <sup>a</sup>	0,42± 0,41 <sup>a</sup>

**Tabela 3.** Porcentagens de imunolocalização de receptor androgênico (AR) nos compartimentos epitelial e estromal, no citoplasma e núcleos da glândula de coagulação dos grupos experimentais. Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre dois grupos experimentais (P<0,05).



**Figura 5.** Fotomicrografias de imunohistoquímica para o receptor de andrógeno (AR) na glândula de coagulação dos grupos experimentais. **A)** Grupo TRCON; **B)** Grupo TRCONJAB; **C)** Grupo TRFLU; **D)** Grupo TRFLUJAB; **E)** Controle negativo das reações, sem incubação com anticorpo primário anti-AR. Setas pretas, cabeças de setas pretas, asteriscos e estrelas, indicam, respectivamente, positividade em núcleos de células estromais, em núcleos de células epiteliais, em citoplasma de células estromais e em citoplasma de células epiteliais.



**Figura 6.** Gráficos demonstrando a frequência de positividade para o receptor de andrógeno (AR) nos compartimentos epitelial **(A)** e estromal **(B)** da glândula de coagulação de camundongos TRAMP. Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre dois grupos experimentais e asteriscos indicam diferença significativa (P<0,05) entre citoplasma e núcleo de um mesmo grupo experimental.

Diante do exposto, a ausência de efeitos significativos do ECJ na morfologia da glândula de coagulação dos grupos experimentais submetidos à ablação androgênica prolongada através da castração cirúrgica e do tratamento com flutamida parece ser um achado condizente com a literatura. Apesar disso, alguns resultados observados após a associação entre ablação androgênica e tratamento com ECJ na análise de distribuição dos parâmetros epiteliais em cada grupo experimental sugerem possíveis efeitos positivos do extrato em promover a desaceleração da progressão para o CPRC no modelo TRAMP. Primeiramente, o grupo TRFLUJAB apresentou incidência de lesões HGNIP semelhante à frequência de LGNIP, achado que não foi verificado no grupo TRFLU (Figs. 2H e 2I; Tabela 1). Em segundo lugar, este grupo experimental demonstrou decréscimo significativo de lesões LGNIP em relação aos focos de CPBD, o que também não ocorreu frente à depleção hormonal isolada (Figs. 2H e 2I; Tabela 1). Por fim, e também contrastando com o grupo TRFLU, os animais do grupo TRFLUJAB exibiram frequência de regiões atróficas semelhantes à de lesões de baixo grau (Figs. 2H e 2I; Tabela 1). Em conjunto, considerando-se que a severidade de lesões pré-malignas é um importante parâmetro a ser avaliado em estudos de quimioprevenção (BERMAN-BOOTY et al., 2011), estes achados indicam o potencial do ECJ como terapia adjuvante durante a evolução do CaP em direção ao CPRC no modelo TRAMP. Assim, sugerimos que tais efeitos possam tornar-se mais evidentes frente a maiores doses do extrato e/ou tratamentos mais prolongados, como o realizado por LAMAS et al. (2020a), com duração de 60 dias.

## CONCLUSÕES:

Os resultados parciais deste estudo demonstraram que a terapia de depleção hormonal *per se* teve marcantes efeitos negativos sobre a progressão do CaP na glândula de coagulação de camundongos TRAMP, possivelmente em razão da ativação de vias de sinalização mediadas por estrógenos após a ablação androgênica, resultando em aumento significativo da agressividade das lesões e da desorganização glandular, como demonstrado pela hipertrofia e hiperplasia verificadas no estroma. Nesse cenário, a administração do ECJ, na dose e período de tratamento aplicados, demonstrou apenas discretos efeitos antitumorais em face da severidade das lesões pré-malignas e malignas observadas, sugerindo novos estudos com a aplicação de diferentes esquemas terapêuticos para avaliar a eficácia do extrato sobre a progressão de lesões primárias nesse lobo prostático.

## BIBLIOGRAFIA

1. BECHIS, S. K.; CARROLL, P. R.; COOPERBERG, M. R. Impact of Age at Diagnosis on Prostate Cancer Treatment and Survival. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 2, p. 235–241, 6 dez. 2010.
2. BERMAN-BOOTY, L. D. et al. A Review of the Existing Grading Schemes and a Proposal for a Modified Grading Scheme for Prostatic Lesions in TRAMP Mice. **Toxicologic Pathology**, v. 40, n. 1, p. 5–17, 21 out. 2011.
3. CHENG, J. et al. A Novel Small Molecule Inhibits Tumor Growth and Synergizes Effects of Enzalutamide on Prostate Cancer. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 371, n. 3, p. 703, 1 dez. 2019.
4. CHO, Y.-M. et al. Suppressive effects of antiandrogens, finasteride and flutamide on development of prostatic lesions in a transgenic rat model. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 10, n. 4, p. 378–383, 2007.
5. GINGRICH, J. R. et al. Androgen-independent Prostate Cancer Progression in the TRAMP Model. **Cancer Research**, v. 57, n. 21, p. 4687, 1 nov. 1997.
6. GINGRICH, J. R. et al. Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 2, n. 2, p. 70–75, 1999.
7. HURWITZ, A. A., FOSTER, B. A., ALLISON, J. P., GREENBERG, N. M., & KWON, E. D. The TRAMP Mouse as a Model for Prostate Cancer. In **Current Protocols in Immunology** (Vol. 45, Issue 1, p. 20.5.1-20.5.23). John Wiley & Sons, Ltd., 2001
8. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Câncer de próstata**.
9. LAMAS, C. A. et al. A jaboticaba extract prevents prostatic damage associated with aging and high-fat diet intake. **Food & Function**, v. 11, n. 2, p. 1547–1559, 2020a.
10. LAMAS, C. A. et al. Brazilian berry extract (Myrciaria jaboticaba): A promising therapy to minimize prostatic inflammation and oxidative stress. **The Prostate**, v. 80, n. 11, p. 859–871, 1 ago. 2020b.
11. LAMAS, C. A. et al. Jaboticaba extract prevents prediabetes and liver steatosis in high-fat-fed aging mice. **Journal of Functional Foods**, v. 47, p. 434–446, 2018.
12. LAMAS, C. A. et al. Jaboticaba extract prevents prediabetes and liver steatosis in high-fat-fed aging mice. **Journal of Functional Foods**, v. 47, p. 434–446, 2018.
13. MARÓSTICA JÚNIOR, M. et al. **Composição compreendendo extrato da casca de jaboticaba, e usos da mesma**. Brasil Instituto Nacional da Propriedade Industrial, INPI, , 17 mar. 2017.
14. MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1991.
15. MOTTAGHIPISHEH, J. et al. The Promising Therapeutic and Preventive Properties of Anthocyanidins/Anthocyanins on Prostate Cancer. **Cells**, v. 11, n. 7, 2022.
16. NOGUEIRA-LIMA, Ellen et al. High-fat diet effects on the prostatic adenocarcinoma model and jaboticaba peel extract intake: protective response in metabolic disorders and liver histopathology. **Nutrition and cancer**, v. 72, n. 8, p. 1366-1377, 2020.
17. RAGHOW, S. et al. Efficacious Chemoprevention of Primary Prostate Cancer by Flutamide in an Autochthonous Transgenic Model. **Cancer Research**, v. 60, n. 15, p. 4093, 1 ago. 2000.
18. WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 12, p. 131–55, 1963.
19. ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall Upper, 1999.
20. ZHANG, Y. Y. et al. Flutamide suppressed prostate hypertrophy in rats and mice. **Zhongguo yao li xue bao= Acta Pharmacologica Sinica**, v. 20, n. 6, p. 537-540, 1999.