



Extrato da casca de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) exerce efeitos benéficos sobre a progressão do câncer de próstata resistente à castração em modelo pré-clínico (TRAMP) através de suas ações antiestrogênicas

Palavras-Chave: CÂNCER DE PRÓSTATA, JABUTICABA, ESTRÓGENOS

Autores(as)

**PALOMA FELIX DA SILVA, FCF – UNICAMP
FABIANA REGINA SCHIEVANO, IB - UNICAMP
FELIPE RABELO SANTOS, IB - UNICAMP
Profa. Dra. VALÉRIA HELENA ALVES CAGNON, IB – UNICAMP
Prof. Dr. FABIO MONTICO (orientador), IB – UNICAMP**

1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é o segundo tipo de câncer que mais afeta homens no mundo, tendo como um de seus principais fatores etiológicos o desequilíbrio hormonal entre andrógenos e estrógenos. Por serem inicialmente dependentes dos andrógenos para o seu crescimento, tumores prostáticos recorrentes e/ou metastáticos são comumente tratados através da terapia de ablação androgênica (ADT). Porém, apesar da eficácia inicial, é comum a evolução do CaP para o fenótipo resistente à castração (CPRC), frequentemente tratado com bloqueadores do receptor androgênico (AR), como a enzalutamida¹⁻⁵.

Além disso, os estrógenos, em conjunto com a testosterona e derivados, influenciam tanto as funções normais da próstata quanto as alterações patológicas^{6,7}. Assim, além da existência de mecanismos de resistência à enzalutamida já conhecidos, a literatura aponta que células tumorais prostáticas também podem escapar da ADT utilizando estrógenos endógenos ou exógenos^{8,9}. Nesse sentido, sabe-se que os receptores de estrógeno alfa (ER α) e beta (ER β) são regulados de formas distintas após a ADT, com a expressão do ER α aumentando e a do ER β diminuindo durante a evolução para o CPRC⁹.

Compostos nutracêuticos, como o extrato da casca de jaboticaba (ECJ), possuem ações antiproliferativa, antiangiogênica, antimetastática e antioxidante, protegendo as células contra mutações e modificações epigenéticas desfavoráveis, além de suprimir a multiresistência a quimioterápicos em diversos tipos de câncer, incluindo o CaP¹⁰⁻¹². O ECJ também demonstrou efeito quimiopreventivo sobre lesões prostáticas associadas à senescência, reduzindo a expressão do AR, do ER α e da enzima aromatase, que atua na conversão de andrógenos em estrógenos¹³.

Diante do exposto, este estudo pretendeu avaliar o potencial do ECJ como terapia adjuvante à ablação androgênica com enzalutamida durante o desenvolvimento do CPRC no modelo transgênico para o adenocarcinoma de próstata (TRAMP). Especial atenção foi dada às vias de sinalização mediadas por hormônios esteroides através da avaliação da expressão proteica dos receptores AR e ER α e dos níveis de 17 β -Estradiol.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados 40 camundongos TRAMP, divididos em 4 grupos experimentais: 1) Grupo TRCON, submetido à simulação da castração cirúrgica e tratado com os veículos da enzalutamida e do ECJ; 2) Grupo TRJAB, submetido à simulação da castração cirúrgica e ao tratamento com ECJ na dose de 5,8 g/Kg por via oral; 3) Grupo TRCAS, castrado cirúrgica (orquiectomia) e quimicamente (tratamento com enzalutamida na dose de 10 mg/Kg por via oral); e 4) Grupo TRCASJAB, submetido à associação dos procedimentos realizados nos grupos

TRJAB e TRCAS. Após 6 semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados e amostras da próstata anterior (glândula de coagulação) foram coletadas para análise sob microscopia de luz, detecção imunohistoquímica e determinação dos níveis proteicos (*Western Blotting*) dos antígenos de interesse. Na avaliação histopatológica, o epitélio prostático foi classificado em cinco parâmetros morfológicos (At: Atrofia; Epitélio saudável; LGNIP: Neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau; HGNIP: Neoplasia intraepitelial prostática de alto grau; CPBD: Adenocarcinoma bem diferenciado), cuja incidência foi determinada em relação ao número total de focos avaliados. Os valores obtidos foram submetidos a uma análise intergrupo, na qual as incidências de um determinado parâmetro morfológico foram comparadas entre os grupos experimentais, bem como a uma análise intragrupo, em que as proporções de epitélio prostático ocupadas por cada parâmetro foram comparadas em um único grupo. Adicionalmente, também foram coletadas amostras de urina dos animais experimentais para determinação dos níveis de 17 β -Estradiol por método imunoenzimático. Os dados quantitativos foram analisados estatisticamente para os diferentes grupos utilizando o GraphPad Prism 8.4.0® para MacOS (GraphPad Software, San Diego, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise histopatológica

3.1.1. Grupo TRAMP Controle (TRCON)

Os ácinos analisados apresentaram morfologia predominantemente saudável (84,37%) (Figs. 1A, 2B e 2F). Lesões do tipo LGNIP foram registradas em 10,30% dos casos (Figs. 1A, 2C e 2F). Os demais parâmetros morfológicos também estiveram presentes totalizando 5,33% do total de focos epiteliais analisados. Lesões do tipo HGNIP foram registradas com incidência de 4,26% (Figs. 1B, 2D e 2F). Adenocarcinomas bem diferenciados responderam por 0,653% do total (Figs. 2E e 2F) e focos de atrofia por 0,428% (Figs. 2A e 2F).

3.1.2. Grupo TRAMP + Extrato da casca de jabuticaba (TRJAB)

O grupo submetido à simulação da castração cirúrgica e ao tratamento com o ECJ apresentou morfologia semelhante ao grupo TRCON, com preservação da histoarquitetura epitelial (92,63%) (Figs. 1C, 2B e 2G). Lesões do tipo LGNIP apresentaram incidência de 4,99%, já os focos de HGNIP 2,38% (Figs. 1C, 1D, 2C, 2D e 2G). A análise histopatológica não demonstrou áreas de atrofia ou adenocarcinoma bem diferenciado nos animais do grupo TRJAB (Figs. 2A, 2E e 2G). Nenhum dos aspectos morfológicos epiteliais apresentou incidência significativamente diferente dos valores observados no grupo TRCON ($P > 0,05$) (Figs. 1C, 1D e 2A-2E).

3.1.3. Grupo TRAMP Castrado (TRCAS)

Os animais submetidos às castrações cirúrgica e química apresentaram predomínio de lesões HGNIP (54,07%) e LGNIP (27,51%), resultando em aumento significativo na incidência em relação ao grupo TRCON ($P < 0,05$) (Figs. 1E, 1F, 2C, 2D e 2H). Analogamente, a incidência de focos de adenocarcinoma também aumentou (14,38%) quando comparada aos controles ($P < 0,01$) (Figs. 1F, 2E e 2H). Ainda, esses animais registraram ausência de áreas de epitélio saudável, com diferença significativa em relação ao TRCON ($P < 0,0001$) (Figs. 2B e 2H). Áreas de atrofia foram observadas em 4,04%, sem diferença estatística do grupo TRCON ($P > 0,05$) (Figs. 2A e 2H).

1.1.4. Grupo TRAMP Castrado + Extrato de casca de jabuticaba (TRCASJAB)

Animais submetidos à ablação androgênica associada ao ECJ apresentaram predominância de lesões HGNIP (46,13%), seguidas por LGNIP (35,67%) e adenocarcinoma bem diferenciado (16,42%), com diferenças significativas em relação a TRJAB ($P < 0,05$ para HGNIP e adenocarcinoma; $P < 0,001$ para LGNIP), mas não em comparação com TRCAS (Figs. 1G, 1H, 2C-2E e 2I). Neste grupo experimental, houve equidade entre as proporções de epitélio prostático ocupadas por HGNIP e LGNIP, observação não registrada no grupo TRCAS, no qual as áreas de HGNIP eram significativamente superiores (Figs. 2H e 2I). As alterações morfológicas resultaram no desaparecimento das áreas de epitélio saudável, com diferença significativa entre TRCASJAB e TRJAB ($P < 0,0001$) (Figs. 2B e 2I). Áreas de atrofia epitelial foram verificadas em 1,79%, sem diferença estatística dos grupos TRJAB e TRCAS ($P > 0,05$) (Fig. 2A).

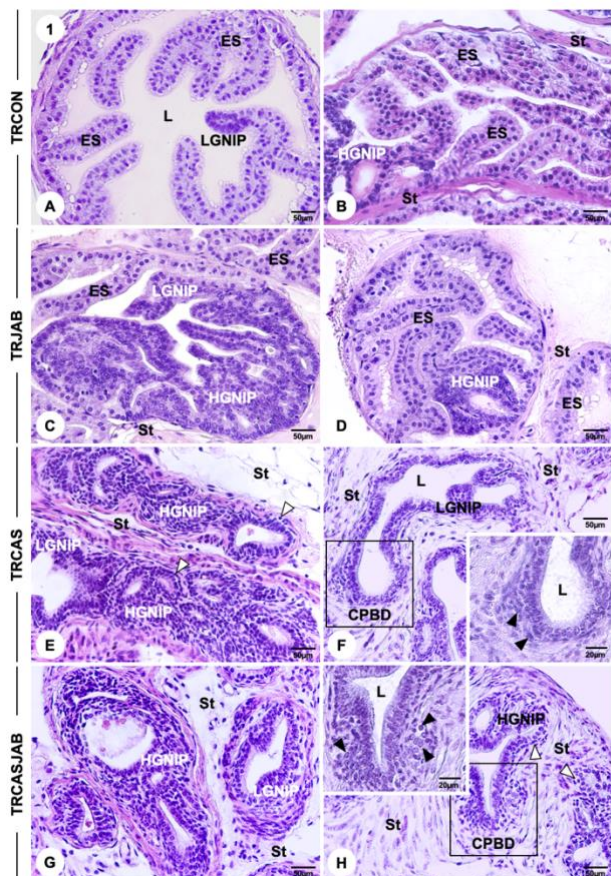


Figura 1. Exemplos de campos microscópicos analisados em animais dos grupos experimentais. AE: Atrófia epitelial; CPBD: Adenocarcinoma bem diferenciado; ES: Epitélio saudável; HGNIIP: Neoplasia intraepitelial prostática de alto grau; LGNIP: Neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau; L: Lúmen; St: Estroma. Os detalhes nas fotomicrografias F e H são ampliações dos focos de CPBD delimitados pelos retângulos. Cabeças de setas brancas indicam células basais. Cabeças de setas pretas indicam invasão de células epiteliais em direção ao estroma.

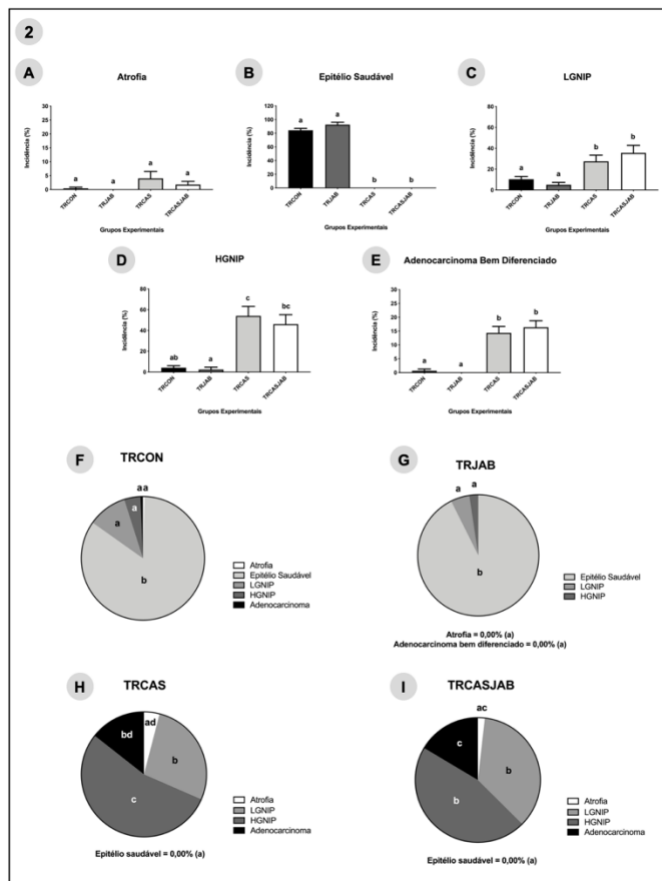


Figura 2. Gráficos de incidência dos diferentes parâmetros morfológicos epiteliais (Atrófia epitelial - AE; Epitélio saudável - ES; Neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau - LGNIP; Neoplasia intraepitelial prostática de alto grau - HGNIIP; e Adenocarcinoma prostático bem diferenciado - CPBD) na glândula de coagulação de camundongos TRAMP. **A-E)** Análise comparativa intergrupos da incidência um determinado parâmetro morfológico. **F-I)** Análise comparativa intragrupo das proporções de área epitelial ocupadas por cada um dos parâmetros. Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre dois grupos experimentais ($p < 0,05$).

Em conjunto, a análise morfológica revelou que a terapia de ablação hormonal não trouxe os efeitos benéficos inicialmente esperados sobre a progressão do CaP na glândula de coagulação do modelo TRAMP, conforme evidenciado pela ausência de epitélio saudável e aumento de lesões pré-malignas e malignas nos grupos TRCAS e TRCASJAB em relação aos seus respectivos controles, TRCON e TRJAB. No entanto, o uso do ECJ como terapia adjuvante à depleção androgênica mostrou resultados promissores, haja vista a redução na proporção de áreas epiteliais ocupadas por HGNIIP em relação à LGNIP observada no grupo TRCASJAB quando comparado a TRCAS, o que sugere atraso na progressão tumoral. Por outro lado, a ausência de alterações marcantes na morfologia glandular frente à administração do ECJ em cenário de repleção hormonal pode estar relacionada com a menor agressividade das lesões glandulares e o ritmo mais lento de progressão tumoral na glândula de coagulação do modelo TRAMP, conforme já reportado por estudos prévios^{14,15}, haja vista que mesmo os animais não tratados apresentaram morfologia epitelial predominantemente saudável.

Tabela 1. Níveis proteicos de mediadores da sinalização hormonal esteroide determinados por *Western Blotting*.

Antígeno	Grupos Experimentais			
	TRCON	TRJAB	TRCAS	TRCASJAB
ER α	100,0 \pm 9,75 ^{ab}	94,84 \pm 7,57 ^a	162,1 \pm 23,13 ^c	156,7 \pm 18,47 ^{bc}
Aromatase	100,0 \pm 5,39 ^a	120,3 \pm 3,23 ^{ab}	161,1 \pm 20,56 ^b	127,3 \pm 16,72 ^{ab}
AR	100,0 \pm 3,57 ^a	118,0 \pm 9,24 ^{ab}	161,3 \pm 15,54 ^b	152,3 \pm 15,81 ^b

3.2. Análise da sinalização hormonal e dos níveis de estradiol

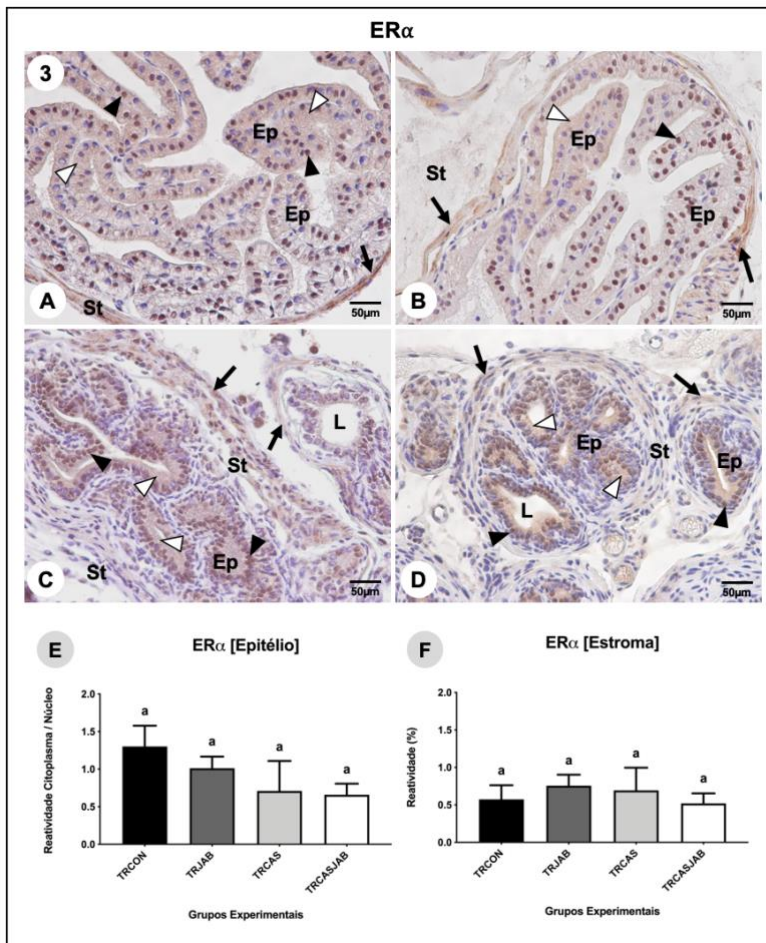


Figura 3. Fotomicrografias de imunohistoquímica para o receptor de estrógeno alfa (ER α) na glândula de coagulação dos grupos experimentais. A) Grupo TRCON; B) Grupo TRJAB; C) Grupo TRCAS; D) Grupo TRCASJAB. Cabeças de setas pretas e brancas indicam, respectivamente, positividade no núcleo e no citoplasma de células epiteliais. Setas pretas indicam reatividade estromal. Ep: Epitélio; L: Lúmen; St: Estroma. Gráficos demonstrando a razão entre as frequências de positividade citoplasmática e nuclear no epitélio (E) bem como a frequência de reatividade no compartimento estromal (F) da glândula de coagulação. Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre dois grupos experimentais ($P < 0,05$).

A reatividade imunohistoquímica do ER α foi contabilizada tanto no citoplasma quanto no núcleo das células epiteliais, bem como no estroma prostático (Figs. 3A-3D). Assim, no epitélio, avaliou-se a razão entre as frequências de reatividade citoplasmática e nuclear deste antígeno, o que constitui um indicativo de seu nível de ativação, uma vez que o mesmo é translocado do citoplasma para o núcleo após interação com o ligante hormonal^{5,8}. Os resultados demonstraram que esse parâmetro não diferiu significativamente entre os grupos experimentais (TRCON: 1,30; TRJAB: 1,01; TRCAS: 0,71; TRCASJAB: 0,66; $P > 0,05$), ainda que tenha havido tendência de decréscimo nos grupos submetidos à ablação hormonal, sugerindo possível alteração na localização subcelular do ER α do citoplasma para o núcleo e aumento da ativação desse receptor (Fig. 3E). Adicionalmente, não houve diferença entre os grupos experimentais no que se refere às frequências médias de imunoreatividade estromal desse receptor (TRCON: 0,57%; TRJAB: 0,76%; TRCAS: 0,69%; TRCASJAB: 0,52%; $P > 0,05$) (Fig. 3F).

As análises de *Western Blotting* demonstraram que o tratamento com o ECJ na presença de andrógenos não alterou os níveis proteicos do ER α ou da enzima aromatase em relação ao grupo controle (Figs. 4A-4B; Tabela 1). Por outro lado, a ablação hormonal isolada resultou em acréscimo significativo dos níveis proteicos desses antígenos comparativamente ao grupo TRCON (Figs. 4A-4B; Tabela 1). Adicionalmente, a administração do ECJ associada à ADT, ainda que não tenha alterado os níveis proteicos dessas moléculas no grupo TRCASJAB em relação ao grupo TRCAS, promoveu decréscimo da expressão de ER α e da aromatase para níveis semelhantes aos do grupo TRCON (Figs. 4A e 4B; Tabela 1). Resultado semelhante foi observado frente à análise dos níveis de 17 β -Estradiol na urina de camundongos dos diversos grupos experimentais, tendo sido registrado aumento significativo desse parâmetro após a castração, com tendência de retorno aos níveis observados no grupo controle quando a ablação hormonal foi associada à administração de ECJ (Fig. 4D). Em conjunto, tais achados sugerem que o ECJ tem potencial para reverter os efeitos desfavoráveis da ADT sobre a glândula de coagulação do modelo TRAMP, como a elevação dos níveis de aromatase e de estradiol e a consequente ativação de vias estrogênicas mediadas pelo ER α , corroborando assim o já conhecido papel dos estrógenos na progressão do CPRC^{8,9}.

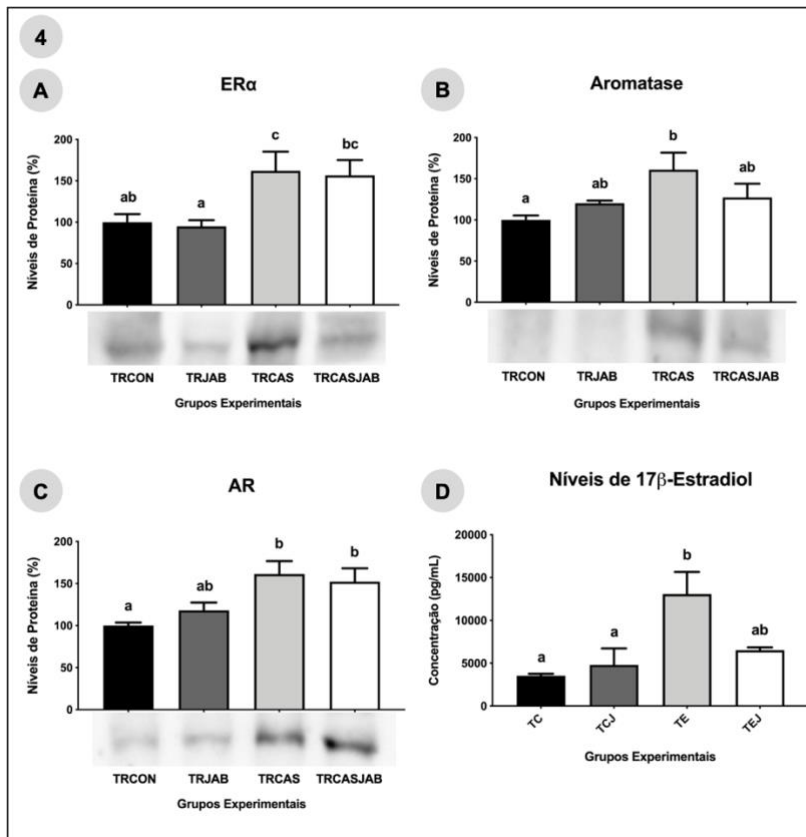


Figura 4. A-C) Níveis proteicos do receptor de estrógenos alfa (ER α), da enzima aromatase e do receptor de andrógenos (AR) na glândula de coagulação dos indivíduos dos grupos experimentais. D) Concentrações de 17 β -Estradiol determinadas por método imunoenzimático a partir de amostras de urina de camundongos TRAMP. Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre dois grupos ($P < 0,05$).

Com relação aos níveis proteicos de AR, estes também demonstraram acréscimo significativo após a ablação hormonal isolada, porém se mantiveram igualmente elevados frente à associação dessa abordagem com o ECJ (Fig. 4C; Tabela 1). Segundo Simanainen *et al.*¹⁶, o *knockout* específico do AR no epitélio prostático teve efeitos mais evidentes sobre a morfologia da glândula de coagulação, sendo este o principal lobo prostático a apresentar aglomerados de células epiteliais em proliferação e hiperplasia de células basais frente a esta manipulação gênica. Tais achados remetem à morfologia glandular observada nos grupos TRCAS e TRCASJAB e demonstram a necessidade da preservação da função do AR no epitélio da glândula de coagulação para a manutenção do estado diferenciado e da quiescência proliferativa de suas células¹⁶.

Com base nesses achados, pode-se postular que, no presente estudo, a diminuição da sinalização androgênica na glândula de coagulação de camundongos TRAMP, imposta pela depleção hormonal, afetou negativamente a diferenciação das células epiteliais prostáticas neste lobo, acelerando a progressão do CaP intrínseca ao modelo pré-clínico em um lobo prostático cujas lesões progridem mais lentamente na presença de andrógenos. Nesse sentido, os maiores níveis proteicos de AR nos grupos experimentais submetidos à ablação hormonal podem ser resultantes da suprarregulação da expressão desse receptor por mecanismo de feedback frente às menores concentrações de ligantes androgênicos.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados permitem concluir que a aromatização de andrógenos em estrógenos, associada à ativação de vias de sinalização mediadas pelo ER α , constituem mecanismos que favorecem a progressão do CPRC na glândula de coagulação do modelo TRAMP frente à ablação androgênica. Conclui-se, ainda, que o ECJ, na dose e período de tratamento aplicados neste trabalho, tem potencial para limitar esses efeitos nocivos da ADT mediados por hormônios estrogênicos, o que sugere a realização de novos estudos com diferentes esquemas e janelas terapêuticas para a avaliação dos efeitos desse extrato no contexto do CPRC.

BIBLIOGRAFIA

- Roy-Burman, P., *et al.* *Endocr Relat Cancer* 11, 225–254 (2004).
- Srinivasan, G., *et al.* *Microsc Res Tech* 30, 293–304 (1995).
- Lau, K.-M. *et al.* *Laboratory Investigation* 83, 743–757 (2003).
- Rice, M. A., *et al.* *Front Oncol* 9, (2019).
- Ramírez-de-Arellano, A. *et al.* *Front Endocrinol (Lausanne)* 12, (2022).
- Cunha, G. R., *et al.* *Differentiation* 70, 473–485 (2002).
- Weihua, Z., *et al.* *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 6330–6335 (2001).
- Qu, L. G., *et al.* *Translational Research* 222, 56–66 (2020).
- Bonkhoff, H. *Prostate* 78, 2–10 (2018).
- Reddy, L., *et al.* *Pharmacol Ther* 99, 1–13 (2003).
- Kallifatidis, G., *et al.* *Semin Cancer Biol* 40–41, 160–169 (2016).
- Costea, T. *et al.* *Int J Mol Sci* 21, (2020).
- Lamas, C. A. *et al.* *Prostate* 80, 859–871 (2020).
- Kaplan-Lefko, P. J. *et al.* *Prostate* 55, 219–237 (2003).
- Gingrich, J. R., *et al.* *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2, 70–75 (1999).
- Simanainen, U. *et al.* *Endocrinology* 148, 2264–2272 (2007).