UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS

EMANUELLE TAVARES RODRIGUES

AVALIAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS FLORES DE *Acmella oleracea (*L.) R. K. JANSEN NA PREVENÇÃO DA HIPERPLASIA BENIGNA DA PRÓSTATA EM RATOS SHR

Macapá/AP
2021

EMANUELLE TAVARES RODRIGUES

AVALIAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS FLORES DE *Acmella oleracea (*L.) R. K. JANSEN NA PREVENÇÃO DA HIPERPLASIA BENIGNA DA PRÓSTATA EM RATOS SHR

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração ensaios biológicos como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Mayara Tania Pinheiro Gomes.

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos.

Macapá/AP
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborada por Jamile da Conceição da Silva – CRB-2/1010

Rodrigues, Emanuelle Tavares.

R696a Avaliação do extrato bruto etanólico das flores de *acmella Oleracea* (L.) R. K. Jansen na prevenção da hiperplasia benigna da próstata em ratos SHR / Emanuelle Tavares Rodrigues - 2021.

1 recurso eletrônico. 89 f : ilustradas.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Macapá, 2021.

Orientadora: Professora Doutora Mayara Tania Pinheiro Gomes

Coorientadora: Professora Doutora Fernanda Cristina Alcântara dos Santos

Modo de acesso: World Wide Web.

Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

Inclui referências, anexos e apêndices.

1. Próstata - Doenças. 2. Próstata – Tratamento. 3. *acmella Oleracea*. I. Gomes, Mayara Tania, orientadora. II. Santos, Fernanda Cristina Alcântara dos, coorientadora. III. Título.

Classificação Decimal de Dewey. 22 ed. 616.65

RODRIGUES, Emanuelle Tavares. **Avaliação do extrato bruto etanólico das flores de *acmella Oleracea* (L.) R. K. Jansen na prevenção da hiperplasia benigna da próstata em ratos SHR**. Orientadora: Mayara Tania Pinheiro Gomes. Coorientadora: Fernanda Cristina Alcântara dos Santos. 2021. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Macapá, 2021.

EMANUELLE TAVARES RODRIGUES

AVALIAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS FLORES DE *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN NA PREVENÇÃO DA HIPERPLASIA BENIGNA DA PRÓSTATA EM RATOS SHR

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração ensaios biológicos como requisito para obtenção do título de mestre.

DATA DE APROVAÇÃO: 29/11/2021

Orientadora: Profa. Dra. Mayara Tania Pinheiro Gomes
Universidade Federal do Amapá/UNIFAP

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos
Universidade Federal de Goiás/UFG

Examinador (a) externo: Prof. Dr. Manoel Francisco Biancardi
Universidade Federal de Goiás/UFG

Examinador (a): Profa. Dra Ana Rita Pinheiro Barcessat
Universidade Federal do Amapá/UNIFAP

Examinador: Prof. Dra. Mayara Amoras Teles Fujishima
Universidade Federal do Amapá/UNIFAP

Macapá/AP
2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que sempre me apoiaram em tudo e me amaram incondicionalmente em cada escolha que fiz durante a vida.
Irlanda e Eliel, vocês me ensinaram que o amor é a educação que transforma.
Depois de aprender a amar, descobri como é fácil aprender todo resto.

AGRADECIMENTOS

Pela dádiva de entender um pouco sobre a vida e tudo que existe nela, pela esperança de dias melhores na eternidade e pela força pra chegar até aqui, agradeço a Deus.

Irlanda e Eliel, sem o apoio de vocês, o incentivo, os conselhos, nada disso seria possível. Sonhamos, choramos e sorrimos juntos, esse título é por vocês!

À minha orientadora Mayara, muito obrigada por me direcionar, pela amizade durante esses anos e pela paciência de pegar na minha mão e me guiar, aprendemos juntas como chegar até aqui! Jamais vou esquecer de como você me ajudou a evoluir desde o começo até esse momento.

Larissa, por todas as vezes que esteve disposta a me ajudar, por ter vibrado comigo em cada conquista como se fossem tuas, muito obrigada! Você sempre acreditou em mim muito antes de eu acreditar.

Paulo, obrigada por ser meu fiel parceiro de jornada acadêmica, por me ouvir tantas vezes e me acalmar, você sabe o que significa chegarmos até aqui. Vencemos essa etapa amigo!

Aderaldo, Maira, Ildilane, Iuri, Gabriela, Luísa e Luiz, obrigada por tornar essa pós graduação uma das aventuras mais lindas que já vivi. Amei ver cada um vocês vencendo essa jornada, quero vocês pra sempre perto de mim!

Esther, muito obrigada por todas as vezes que você me ajudou a ficar calma, com a vida acadêmica e com os procedimentos, a maioria deu certo porque você me mostrou como. Tua calma e confiança me inspiraram muitas vezes.

Cinthia, obrigada por todos os sorrisos! Você transformou meu ambiente de trabalho num lugar onde eu queria sempre estar. Obrigada por toda ajuda.

Edvaldo, obrigada por ser tão paciente me ensinando e me ajudando dentro e fora do laboratório, agradeço de coração.

Ao LaMARe, à Professora Fernanda e Professor Manoel, meu muito obrigada pelo acolhimento como integrante do laboratório, foi aqui que aprendi a me sentir parte de uma comunidade acadêmica, principalmente a aprender, a somar e a crescer como pesquisadora. Orgulho de fazer parte, mesmo que indiretamente, dessa família.

Ao LAAB por ser uma das minhas primeiras casas, especialmente ao professor Messias, por me ensinar a humildade de um grande pesquisador. Levarei comigo essa grande admiração.

À professora Mayara Amoras, muito obrigada por tornar a docência algo divertido e leve, foi uma experiência incrível.

À professora Ana Rita Barcessat e Professora Alessandra Azevedo agradeço a confiança ao aceitarem participar da minha banca, é uma honra pra mim ter vocês nesse processo.

À CAPES, pelo fomento nessa longa jornada, especialmente por ter auxiliado por 1 ano a mais que o previsto.

A todos que me ajudaram de alguma forma, muito obrigada. Pra mim foi uma honra.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização da próstata masculina.

Figura 2 - Anatomia da próstata do humano adulto e do rato adulto.

Figura 3 – Próstata hiperplásica.

Figura 4 – Flores e folhas de *Acmella oleracea*.

Figura 5 – Área de coleta do material vegetal realizado no Distrito da Fazendinha, Macapá-AP: (a) vista frontal e (b) imagem por satélite.

Figura 6 – Etapas de preparo do material vegetal.

Figura 7 – Etapas de obtenção do extrato etanólico das flores de *A. oleracea*.

Figura 8 – Delineamento e grupos experimentais.

Figura 9 – Cromatograma da amostra EEFAo (a) e do (padrão) (b).

Figura 10 – Pressão arterial sistólica dos grupos SHR e W.

Figura 11 – Análise histopatológica do fígado e rim dos grupos SHR e W

Figura 12 – Histologia da próstata ventral dos ratos SHR e W.

Figura 13 - Análise histopatológica da próstata ventral de roedores SHR e W – Grau de hiperplasia.

Figura 14 - Análise do estroma da glândula prostática – fibras colágenas

Figura 15 - Quantificação da área de secreção PAS-positiva na próstata ventral de ratos SHR e Wistar.

Figura 16 - Imuno-histoquímica para AR. Reação imuno-histoquímica para receptores de andrógeno (AR) na próstata ventral de SHR e Wistar.

Figura 17 – Reação de Imuno-histoquímica para PCNA e Frequência relativa (%) das células PCNA positiva na próstata de SHR e Wistar.

Figura 18 – Marcador de estresse oxidativo e Atividade Enzimática na próstata de ratos macho SHR.

Figura 19 - Marcador de estresse oxidativo e Atividade Enzimática na próstata de ratos macho Wistar.

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Sintomas da HBP.

Tabela 2 - Tempo de eluição do gradiente no UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS

Tabela 3 – Dados quantitativos da amostra de EEFAo 92,8% de *Acmella oleracea*.

Tabela 4 – Dados biométricos dos ratos SHR e W de todos os grupos experimentais.

Tabela 5 – Dados estereológicos obtidos após análise da próstata ventral de ratos SHR e W após o tratamento.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5ARIs - Inibidor da 5α-redutase

ADRα1 - Adreno receptor-alfa1

AOEE-F – Extrato das flores de *Acmella oleracea*

AOEE-L – Extrato das folhas de *Acmella oleracea*

BOO – Obstrução da saída da bexiga

CAT – Catalase

CML – Células musculares lisa

CP – Câncer de próstata

CV – Doenças cardiovasculares

DE50% - Dose efetiva de 50%

DMSO – Veículo dimetilsulfóxido

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EHAo – Extrato hidroetanólico de *Acmella oleracea*

EEFAo – Extrato etanólico das flores de *Acmella oleracea*

GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

HAMAB – Herbário Amapaense

IBA - Isobultilalquilamida sintética

IEPA - Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá

IgG2a - Isotipo 2a de imunoglobulina

IL-1β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IPSS - Escore internacional de sintomas prostáticos

LAAB – Laboratório de Absorção Atômica e Bioprospecção

LBPN – Laboratório de Biotecnologia em Produtos Naturais

LPO – Peroxidação Lipídica

LUTS – Sintomas do trato urinário inferior

MDA - Malondialdeído

MTT – Ensaio colorimétrico (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio)

PAS – Quantificação da área de secreção

PBS - Tampão fosfato-salino

PC-3 – Linhagem celular de câncer na próstata

PCNA - Antígeno nuclear de proliferação celular

PDE-5 – 5-fosfodiesterase

PSA - Antígeno prostático específico

SEE – Extrato enriquecido com silimarina

SISGEN - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SKOV-3 - Linhagem celular de câncer ovarino

SOD – Superóxido dismutase

SRD5A1 – 3-Oxo-5α-esteróide 4-desidrogenase 1

STZ - Estreptozotocina

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

ZC – Zona central

ZP – Zona periférica

ZT – Zona de transição

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Ångström
λ	Lamba (Comprimento de onda)
min	Minutos
mg/mL	Miligrama/Mililitro
m/z	Razão carga/massa
nm	Nanômetro
ppm	Partes por milhão
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia/Mililitro
µg/mL	Micrograma por mililitro
µm	Micrômetro
v/v	Volume/Volume

RESUMO

A Hiperplasia benigna da próstata (HBP) é uma doença que se desenvolve em homens, a partir dos 40 anos e que progride com o avanço da idade. Mesmo sendo benigna, a falta de cuidados pode causar muitos incômodos na qualidade de vida, somado aos efeitos colaterais dos medicamentos. Na busca de novas terapias com o uso de plantas medicinais para a prevenção de doenças da próstata, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial terapêutico do extrato bruto etanólico das flores de *Acmella oleracea* R. K. Jansen (EEFAo) na prevenção da HBP em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Para isso foram utilizados 40 ratos machos jovens, sendo 20 ratos SHR e 20 ratos Wistar (W), com idade de 9 semanas. Os animais foram tratados via gavagem por 60 dias consecutivos. O grupo controle recebeu diariamente 100 µL de solução salina e os animais do grupo tratado receberam 100 mg / kg de EEFAo diluído em 100 µL de solução salina. Para avaliar os efeitos do extrato na prevenção da HBP, após eutanásia, os órgãos foram coletados e submetidos às análises histopatológicas, morfométrico-estereológicas, imuno-histoquímicas e bioquímicas. As análises histopatológicas mostraram a ocorrência de HBP nos animais SHR, assegurando que é uma doença típica do modelo animal. Morfologicamente observou-se que o tratamento reduziu o grau de hiperplasia no grupo SHR, devido à diminuição no epitélio prostático e aumento do compartimento luminal quando comparado ao controle. O tratamento aumentou a atividade secretora nos animais SHR e nos animais W provocou uma redução. Também reduziu fibras colágenas na próstata de SHR. Constatou-se um aumento de peso nos testículos no grupo W. Na avaliação imuno-histoquímica observou-se redução da proliferação celular, diminuindo a frequência de células PCNA-positivas no grupo SHR. Houve uma diminuição de receptores androgênicos nas células prostáticas do grupo W. As análises bioquímicas indicaram que o EEFAo agiu como antioxidante na próstata de todos os grupos reduzindo os níveis de MDA (malondialdeído) e aumentando a atividade da SOD (superóxido dismutase) e CAT (catalase). Os dados apontam que o EEFAo é eficaz na prevenção de hiperplasia benigna na próstata ventral de SHR, pois atenua os aspectos morfológicos e age com efeito antioxidante.

Palavras chave: Hiperplasia Benigna da próstata; *Acmella oleracea*; doenças da próstata; prevenção.

ABSTRACT

Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) is a disease that develops in men from the age of 40 onwards and progresses with advancing age. Even though it is benign, lack of care can cause many problems in quality of life, in addition to the side effects of medications. In the search for new therapies using medicinal plants for the prevention of prostate diseases, the aim of this study was to evaluate the therapeutic potential of the crude ethanol extract of *Acmella oleracea* R. K Jansen flowers (EEFAo) in the prevention of BPH in spontaneously hypertensive rats (SHR). For this, 40 young male rats, 20 SHR rats and 20 Wistar rats (W), aged 9 weeks were used. The animals were treated via gavage for 60 consecutive days. The control group received 100 µL of saline solution daily and the animals in the treated group received 100 mg/kg of EEFAo diluted in 100 µL of saline solution. To evaluate the effects of the extract in preventing BPH, after euthanasia, organs were collected and submitted to histopathological, morphometric-stereological, immunohistochemical and biochemical analyses. Histopathological analyzes showed the occurrence of BPH in SHR animals, ensuring that it is a typical disease of the animal model. Morphologically, it was observed that the treatment reduced the degree of hyperplasia in the SHR group, due to a decrease in the prostatic epithelium and an increase in the luminal compartment when compared to the control. The treatment increased the secretory activity in SHR animals and in W animals caused a reduction. It also reduced collagen fibers in the prostate of SHR. There was an increase in weight in the testes in group W. In the immunohistochemical evaluation, a reduction in cell proliferation was observed, decreasing the frequency of PCNA-positive cells in the SHR group. There was a decrease in androgen receptors in group W prostate cells. Biochemical analyzes indicated that EEFAo acted as an antioxidant in the prostate of all groups, reducing MDA (malondialdehyde) and increasing SOD (superoxide dismutase) and CAT (catalase). The data show that EEFAo is effective in preventing benign hyperplasia in the ventral prostate of SHR, as it attenuates the morphological aspects and acts with an antioxidant effect.

Key-Words: Benign hyperplasia of the prostate; *Acmella oleracea*; prostate diseases; prevention.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

2 OBJETIVOS 18

2.1 OBJETIVO GERAL 18

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 18

3 REFERENCIAL TEÓRICO 19

3.1 PRÓSTATA MASCULINA 19

3.1.1 Regulação hormonal da próstata 21

3.2 HIPERPLASIA BENIGNA DA PRÓSTATA (HPB) 22

3.2.1 Epidemiologia e Fatores de Risco da HBP 25

3.2.2 Sintomas, tratamento da HBP e efeitos colaterais 29

3.2.3 Plantas medicinais como tratamento alternativo da HBP 32

3.2.4 *Acmella oleracea* (L) R. K. JANSEN 34

4 MATERIAL E MÉTODOS 38

4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DO MATERIAL VEGETAL 38

4.2 PREPARO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS FLORES DE *Acmella oleracea (*EEFAo) 38

4.3 ANÁLISE DO EXTRATO POR CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (UHPLC-ESI-QTOF-MS). 40

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE BIOMÉTRICA 41

4.5 PLETISMOGRAFIA - AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA 42

4.6 PREPARO HISTOLÓGICO PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA DE LUZ 42

4.7 ESTEREOLOGIA E MORFOMETRIA 43

4.8 IMUNO-HISTOQUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO CELULAR 43

4.9 TESTES BIOQUÍMICOS 44

4.9.1 Níveis de peroxidação lipídica (LPO) 44

4.9.2 Níveis de proteína carbonilada (CP) 44

4.9.3 Atividade de superóxido dismutase (SOD) 45

4.9.4 Atividade da catalase (CAT) 45

4.9.5 Determinação do teor de proteína 45

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA 45

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES 46

5.1 ANÁLISE DO EXTRATO POR CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSA (UHPLC-ESI-QTOF-MS) 46

5.2 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA 50

5.3 BIOMETRIA....51
5.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO E RIM....53
5.5 MORFOLOGIA E ESTEREOLOGIA....55
5.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA RECEPTORES DE ANDRÓGENOS (AR)....63
5.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA PCNA....64
5.8 TESTES BIOQUÍMICOS....67
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS....70
REFERÊNCIAS....71

1 INTRODUÇÃO

A próstata é uma glândula com predisposição a aumentar de tamanho nos homens a partir dos 40 anos podendo ocasionar uma compressão na uretra, que dificulta o fluxo urinário tornando-o mais fraco e lento. Essas alterações aparecem quando as células da próstata começam a se dividir e se multiplicar de forma desordenada.

Destas alterações, cita-se a hiperplasia benigna da próstata (HBP), considerada a neoplasia benigna mais comum em homens de idade avançada, com prevalência de 10%, 50% e 90% respectivamente aos 25, 60 e 80 anos de vida. As manifestações clínicas por crescimento benigno da próstata provocam sintomas urinários que geram impacto negativo na qualidade de vida dessa população. Estima-se em 30% a chance de um homem, durante sua vida, necessitar tratar sintomas decorrentes da HBP e, aproximadamente 10% de ser submetido a tratamento cirúrgico (NG; BARADHI, 2020).

Histologicamente a HBP pode ser caracterizada pelo aumento do número de células epiteliais e estromais na área periuretral da próstata, aumentando a proliferação desses grupos celulares e diminuindo a morte celular programada ou apoptose. Os sintomas dessa doença no trato urinário inferior têm impacto importante na qualidade de vida e interferem em atividades comuns diárias e nos padrões normais do sono, já que o principal sintoma é o aumento da micção noturna (AUFFENBERG; HELFAND; MCVARY, 2009; MACEY; RAYNOR, 2020).

A terapêutica mais utilizada no alivio dos sintomas são os inibidores da 5α-redutase (5ARIs), por sua associação com efeitos colaterais sexuais adversos. Esses efeitos estão relacionados a problemas sexuais, comportamentais e até mesmo danos cardiovasculares, levando os pacientes a descontinuidade do tratamento (SONG *et al.*, 2021). Diante desta problemática, a busca por terapias alternativas com menos efeitos colaterais e de baixo custo torna-se crescente. Neste cenário, destacam-se as plantas medicinais com ação promissora, que podem ser utilizadas no âmbito das doenças prostáticas, algumas delas já de uso tradicional secular.

Os primeiros extratos de plantas prescritos para a gestão de sintomas do trato urinário inferior em homens clinicamente diagnosticados com HBP foram derivados de *Serenoa repens* (Saw palmetto) e *Epilobium parviflorum* (epilóbio). Seguido de outras espécies como, *Cucurbita pepo* (sementes de abóbora), *Pygeum africanum* (ameixa africana), *Urtica dioica* (urtiga), *Scale cereale* (centeio) e *Hypoxis rooperi* (batata africana) (OATES, 2016).

Dentre as espécies vegetais promissoras ao tratamento dos sintomas da HBP cita-se a *Acmella oleracea (*L) R. K Jansen, popularmente conhecida como Jambu. São atribuídas à *A.*

olerace diversas atividades biológicas como: analgésica (BOONEN *et al*., 2010; DUBEY *et al*., 2013), anti-nociceptiva (CHAKRABORTY *et al*., 2010), antioxidante (ABEYSIRI *et al*., 2013; PINHEIRO, 2015; LALTHANPUII, *et al*., 2017; RONDANELLI *et al*., 2020), anti-inflamatória (WU *et al*., 2008), diurética (VANAMALA *et al*., 2012), vasodilatadora (WONGSAWATKUL *et al*., 2008) e afrodisíaca (REVILLA, 2002; CAVALCANTE, 2013).

Diante do exposto, devido seu alto valor nutricional, baixo valor comercial, fácil acesso e inúmeras aplicações na medicina popular, sugere-se que o extrato bruto etanólico das flores de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen seja capaz de prevenir a HBP espontânea em ratos SHR.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial preventivo do EEFAo na hiperplasia benigna prostática em SHRs.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o perfil fitoquímico do EEFAo por cromatografia em fase líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (UHPLC-ESI-QTOF-MS);
- Investigar se o tratamento precoce com o EEFAo previne a ocorrência de hiperplasia benigna prostática em ratos SHR jovens;
- Investigar se o tratamento com EEFAo atenua as alterações morfológicas prostáticas típicas de ratos SHR adultos;
- Avaliar o perfil de proliferação celular e de receptores androgênicos na próstata de todos os grupos experimentais SHR e W;
- Avaliar bioquimicamente os efeitos do EEFAo sobre a atividade da catalase e da superóxido dismutase, malondialdeído e proteína carbonilada;
- Investigar os possíveis efeitos tóxicos do EEFAo por meio da análise histopatológica do fígado e dos rins.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PRÓSTATA MASCULINA

A glândula prostática faz parte do sistema reprodutor masculino. Encontra-se na parte inferior do abdômen abaixo da bexiga e à frente do reto, envolve a porção inicial da uretra, tubo pelo qual é eliminada a urina que fica armazenada na bexiga (ARILTON *et al.*, 2015) (Figura 1).

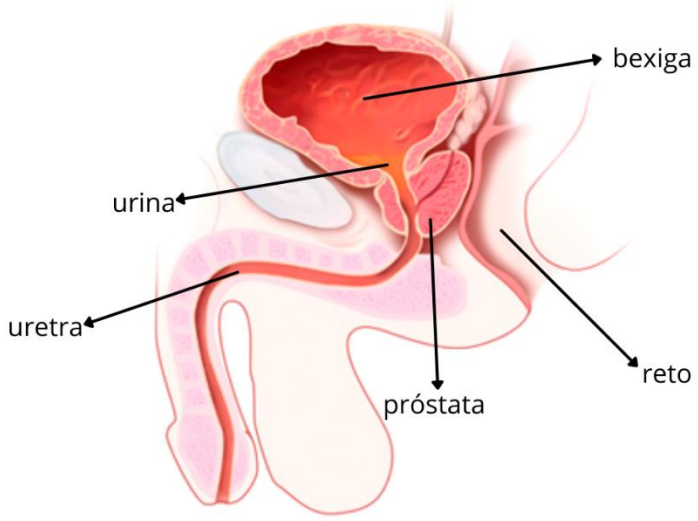

Figura 1. Localização da próstata masculina. Fonte: Adaptada de https://blog.wellspect.com/whats-the-difference-between-enlarged-prostate-bph-and-prostate-cancer.

A próstata possui cerca de 4 cm de largura e o seu tamanho aumenta aos poucos da infância até a adolescência. Aumenta rapidamente até os 30 anos e se mantém estável até os 40, 45 anos. Essa glândula secreta um líquido que contém diversas substâncias, como o ácido cítrico, enzimas proteolíticas, fosfatase ácida e plasmina seminal que contribuem para a motilidade e viabilidade dos espermatozoides (ALSHAHRANI *et al.*, 2013; TORTORA; DERRICKSON, 2016; AARON, FRANCO; HAYWARD, 2016).

Anatomicamente, Lowsley (1912), estudando embriões humanos, propôs a divisão da próstata em cinco lobos: anterior, posterior, dois laterais e um central. Um novo conceito de divisão da próstata humana foi proposto por McNeal (1968). Ao longo do tempo, este conceito inicial foi modificado pelo próprio McNeal (1981a; 1981b; 1988). Propondo, então três grandes zonas anatômicas: zona periférica (ZP), zona central (ZC) e zona de transição (ZT), que seriam diferentes histológica e biologicamente.

Histologicamente a glândula prostática humana é coberta por um estroma fibromuscular denso, e diversas regiões não-glandulares significativas que se concentram na porção ântero-medial da glândula. Cada zona glandular tem característica estrutural e estromal própria (MCNEAL, 1988; UNTERGASSER; MADERSBACHER; BERGER, 2005). No epitélio prostático são encontradas as células secretoras ou luminais, as células basais, células intermediárias e células neuroendócrinas. Cada uma das células epiteliais prostáticas basais e luminais expressam um conjunto único de queratinas e outros marcadores de diferenciação (WANG *et al*., 2001). As células estromais incluem fibroblastos, células musculares lisas (CML) além de células nervosas, células endoteliais e células do sistema imune (ABATE-SHEN; SHEN 2000).

A próstata humana quando comparada à de roedores apresenta lobos distintos. A próstata do rato é composta por quatro lobos: ventral, lateral, dorsal e anterior, relativo à sua posição à bexiga (SHIRAI *et al*., 2000; BOSLAND, 1996) (Figura 2B).

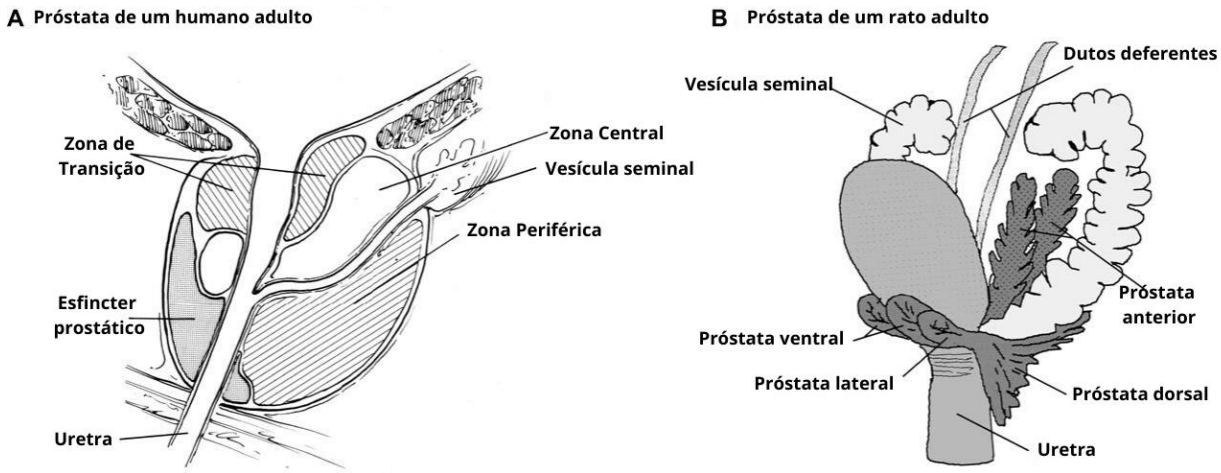

Figura 2. Anatomia da próstata do humano adulto e do rato adulto. Esquemas da glândula prostática humana (A) e rato adulto (B). Estruturas e regiões da próstata são indicadas. Adaptada de Cunha *et al*. (1987) e McNeal (1969), adaptado de Abate-Shen e Shen (2000).

O conhecimento dos diferentes lobos da próstata de ratos é importante, pois a capacidade de desenvolver carcinomas varia entre eles (SHIRAI *et al*., 2000). Esses roedores são comumente utilizados em pesquisas experimentais de neoplasias pois são relativamente fáceis e baratos de manter, sua fisiologia e genética também são bem conhecidas quanto ao desenvolvimento de tumores na próstata e todas as etapas da carcinogênese como iniciação, progressão e metástase podem ser observadas (LUCIA *et al*., 1998; FAGUNDES; TAHA, 2004). Contudo, o uso de modelos de roedores tem algumas desvantagens como as diferenças anatômicas com humanos, próstata lobulada em roedores vs. próstata não lobulada em homens

(CEKANOVA; RATHORE, 2014) (Figura 2). Apesar disso, em termos histológicos, a próstata de roedores também apresenta compartimento epitelial e estromal com os mesmos tipos celulares já descritos para humanos.

Como exemplo de roedores manuseados em experimentos, cita-se o SHR que tem sido usado há algum tempo para estudos de hipertensão genética e por exibirem anormalidades morfológicas hiperplásicas na próstata ventral (NAKAMURA *et al.,* 1991; GOLOMB *et al*., 2000). Essas alterações hiperplásicas na próstata ventral do SHR são desenvolvidas com o avanço da idade e podem ser observadas na 15ª semana de idade (YONO *et al*., 2007). Foram feitas comparações histopatológicas e de microscopia eletrônica em células epiteliais da próstata de SHRs e comparados com os de ratos Wistar, onde o tecido da próstata de SHR apresentou retardo de desenvolvimento com 5 semanas de idade (NAKAMURA *et al*., 1991). O fluxo sanguíneo na próstata dorsolateral e ventral em SHR é significativamente reduzido em comparação com os ratos Wistar. Essas variações indicam que a próstata de roedores, especialmente a próstata ventral do SHR, é um bom modelo para o estudo de HBP em humano (YONO *et al*., 2007).

3.1.1 Regulação hormonal da próstata

A fisiologia da próstata é regulada por hormônios andrógenos, com papel fundamental no desenvolvimento, manutenção e regulação do fenótipo e fisiologia reprodutiva masculina (TABOGA; VILAMAIOR; GÓES, 2009).

Como exemplos de andrógenos, temos a testosterona (T), sendo sua forma mais ativa a DHT, o androstenediol e a androstenediona. 95% corresponde à T produzida nas células de Leydig dos testículos, estimulado pelo hormônio luteinizante da hipófise, que por sua vez, é regulado pelo hormônio liberador de gonadotrofinas do hipotálamo. Os outros 5% de andrógenos são sintetizados nas adrenais sob a ação do hormônio adrenocorticotrótico da hipófise e liberados principalmente na forma de androstenediona, convertida em T perifericamente (CARVALHO-SALES; TAJARA, 1999).

A conversão de T em 5α-diidrotestosterona (DHT) é realizada pela enzima 5α-redutase, com função fundamental para a morfogênese da próstata. A concentração tecidual de DHT na próstata adulta se mantém elevada quando comparada aos níveis plasmáticos. Esses hormônios desempenham funções diferentes apesar de ambos atuarem pelo receptor de andrógenos (AR). Os dois são capazes de manter a atividade prostática, porém a DHT se apresenta mais potente que a T (RITTMASTER *et al.*, 1991; VILAMAIOR *et al*., 2003).

Através do AR, um fator de transcrição, membro da superfamília de proteínas regulatórias nucleares, os hormônios andrógenos exercem seus efeitos biológicos (EVANS, 1988). Após a ligação desses hormônios ao AR no citoplasma, ele pode então ser ativado e transportado para o núcleo, onde, em conjunto com uma série de co-ativadores e co-repressores, ativa ou inativa genes que influenciam no desenvolvimento e manutenção prostática (WEN *et al*., 2015).

Outro hormônio atuante na próstata masculina que também exerce função essencial na homeostase do tecido prostático é o estrógeno. Por meio da enzima aromatase esse hormônio pode ser obtido através da conversão da T em 17β-estradiol e também são sintetizados pelas células de Leydig (GRUMBACH; AUCHUS, 1999; ELLEN; RISBRIDGER, 2009; COOKE *et al*., 2017).

Mesmo que a próstata dependa de andrógenos, os estrógenos também influenciam as funções normais e as mudanças patológicas nesse órgão em razão de dois receptores: ER-α e ER-β, que são os receptores que mediam toda a ação do estrogênio. ER-α é expresso em todo o tecido prostático durante a vida fetal e neonatal precoce. Já a expressão de ER-β está localizada principalmente no epitélio, e é importante durante os próximos períodos de desenvolvimento, como puberdade e idade adulta, regulando a proliferação e diferenciação celular no tecido adulto (WEIHUA *et al.,* 2001; MCPHERSON; ELLEM; RISBRIDGER, 2009).

Andrógenos e estrógenos executam funções significativas na próstata e são críticos tanto para o crescimento e desenvolvimento normal da próstata, bem como para a manutenção da homeostase prostática no decorrer da vida adulta. Portanto, um desbalanço na função dos ARs ou nos níveis de androgênios e estrogênios pode promover a proliferação celular excessiva da glândula, levando ao desenvolvimento de doenças da próstata (MCPHERSON; ELLEM; RISBRIDGER, 2008; DUTT; GAO, 2009; SCOTT; MUNKLEY, 2019).

3.2 HIPERPLASIA BENIGNA DA PRÓSTATA (HBP)

A HBP manifesta-se clinicamente em humanos como sintomas do trato urinário inferior (LUTS) consistindo em obstrução e sintomas irritativos da bexiga e uretra (DHINGRA; BHAGWAT, 2011). O LUTS pode resultar de uma variedade de condições, incluindo itens relacionados à inervação e envelhecimento da bexiga, e também a obstrução do fluxo de saída (BOO) causada em consequência da HBP. O LUTS causado por HBP aumenta com a idade, e quase todos os homens apresentam HBP histológica por volta dos 90 anos. A HBP geralmente não é considerada uma lesão precursora do câncer de próstata (HAYWARD, 2016) mas é importante entender como funciona o mecanismo dessa doença.

Histologicamente, a HBP se desenvolve quando há hiperplasia no epitélio e crescimento estromal que coalescem microscópica e macroscopicamente formando nódulos na próstata. O estágio microscópico da HBP eventualmente irá ocorrer em homens com idade avançada, porém apenas cerca de metade desses homens apresentarão a HBP microscópica que poderá evoluir para o aumento macroscópico da próstata (AJAYI; ABRAHAM, 2018). Este quadro pode resultar na compressão da uretra e causar resistência ao fluxo urinário conhecido como BOO (ROEHRBORN, 2008) (Figura 3).

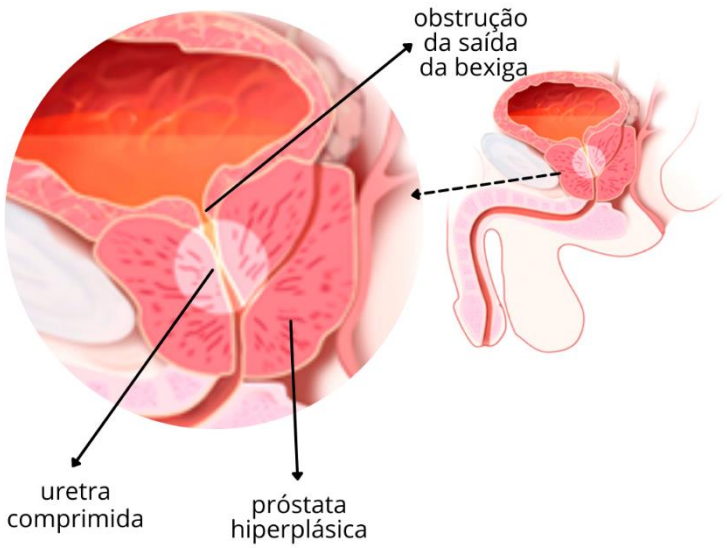

Figura 3. Próstata hiperplásica. Uretra comprimida pelo aumento anormal da próstata impedindo a saída de urina. Fonte: Adaptada de https://blog.wellspect.com/whats-the-difference-between-enlarged-prostate-bph-and-prostate-cancer.

A hiperplasia dos elementos glandulares na zona periuretral e nos elementos estromais na zona de transição da próstata, são os responsáveis pelos sintomas relatados e são dependentes da biodisponibilidade de testosterona e DHT (BARTSCH; RITTMASTER; KLOCKER, 2000; SARMA; WEI, 2012; LANGAN, 2019).

O envelhecimento dos homens provoca naturalmente uma diminuição gradativa na concentração média de testosterona sérica. Com a queda desse hormônio ocorre um declínio na proporção de testosterona para 17β-estradiol no soro, o que pode ser crítico na patogênese dessa doença, podendo haver também alteração da sensibilidade da próstata à testosterona sérica (BRENDLER *et al.*, 1983; BANERJEE *et al.*, 2018).

Apesar da fisiopatologia da HBP não ser completamente compreendida nas pesquisas existentes, entende-se que os sintomas mais graves são mediados por uma série de receptores, como os α-adrenérgicos, muscarínicos e 5-fosfodiesterase (PDE-5) (SCHWINN E ROEHRBORN, 2008; ANDERSSON *et al*., 2011).

Esses diferentes mecanismos moleculares que iniciam a HBP dão margem à várias teorias, a primeira, a ação da 5α-diidrotestosterona (produto da conversão da T pela enzima 5α-redutase) cujo aumento da concentração na região prostática promove a desregulação da interação estroma-epitélio, sendo considerado fator responsável pelo desenvolvimento da doença (AJAYI; ABRAHAM, 2018). Outra alteração, também hormonal, é o aumento das concentrações de estrógenos no interior da glândula prostática. O estradiol, metabolizado pela enzima aromatase, aumenta a atividade estimuladora da proliferação celular nessa região (SROUGI, 2011).

Além do mais, existe a hipótese de que a HBP é em parte mediada por receptores α1–adrenérgicos (ADR-α1) associados com o músculo liso da próstata, sendo este um dos principais constituintes celulares da HBP (CAINE, 1986; MATHUR *et al*., 2014). A presença de ADR-α1 faz com que a próstata humana se contraia. Visto que, em próstatas hipertrofiadas foi observado um aumento de ADRs nessa região presumindo a estimulação do aumento dos tônus do musculo liso da bexiga e da próstata (GUERRA, 2011). Os níveis altos desse receptor e norepinefrina no músculo liso da próstata humana indicam o papel significativo nas inervações adrenérgicas da função prostática. Ocasionando além de BOO, uma constrição uretral, sendo estes agentes principais na fisiopatologia e na sintomatologia da HBP (CAINE; PERLBERG; GORDON, 1975; MATHUR *et al*., 2014).

Outras hipóteses como o aumento da secreção de fatores de crescimento nervoso, a diminuição da expressão do canal TREK-1, alteração na expressão de canais de K+, além da ativação de receptores muscarínicos explicam a obstrução infravesical que provoca alterações na musculatura detrusora e induz à bexiga hiperativa (necessidade súbita de urinar) (MENG *et al*., 2012). Já a PDE-5 presente em toda vasculatura, principalmente no tecido cardíaco, corpo cavernoso, próstata, bexiga e uretra, tem papel importante na degradação de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e guanosina monofosfato cíclico (GMPc), seu possível significado funcional envolve ereção, tónus do músculo liso e agregação plaquetar. No entanto a degradação provocada pela PDE-5 leva a contração do musculo liso, que, como já dito, é responsável pelas alterações que envolvem a HBP e também problemas de ereção (ROEHRBORN, 2004).

Sendo assim, o desenvolvimento da HBP está diretamente relacionado ao avanço da idade, principalmente quando ligado ao controle genético hormonal e ambiental. Fatores metabólicos e o estilo de vida, incluindo obesidade, diabetes, dieta e exercício são igualmente importantes na etiologia dessa patologia e do LUTS (MOEBLEY; FEIBUS; BAUM, 2015).

3.2.1 Epidemiologia e Fatores de Risco da HBP

Dados apontam para uma prevalência de 8% aos 40 anos, de 50% aos 60 anos e de 80% aos 90 anos. Um em cada quatro homens entre 40 e 50 anos recebe tratamento para a HBP, este valor aumenta para três em quatro homens com idade superior a 70 anos. Abaixo dos 30 anos, a HBP está praticamente ausente (LIM, 2017; CALOGERO *et al*., 2019).

Além disso, a idade pode ativar outros fatores de risco como hipertensão, hiperlipidemia e aterosclerose, todos ligados de alguma forma à etiologia dos sintomas do trato urinário inferior, disfunção erétil e HBP (SHIMIZU *et al*., 2014; SHIMIZU *et al*., 2020).

3.2.1.1 Idade

O estudo pioneiro de autópsia realizado por Berry *et al*. (1984) mostrou claramente a idade como fator associado ao desenvolvimento da HBP. Nesse estudo foi demonstrado que nenhum homem com menos de 30 anos tinha desenvolvido a doença. O estudo longitudinal de Baltimore (SHOCK, 1984) sugeriu um aumento do volume da próstata de 2,0 a 2,5% ao ano em homens mais velhos (RUSSO; URZÌ; CIMINO, 2018).

Em estudos direcionados apenas a homens mais velhos, é relatado que muitos têm vida sexual ativa. Porém, a maioria dos homens entre as idades de 50 e 75 anos relatam que apesar de sexualmente ativos, sofrem incômodos por problemas com questões sexuais, incluindo disfunção erétil. Esse problema está diretamente associado ao fato de que a maioria faz uso do tratamento medicamentoso padrão para LUTS e HBP, onde efeitos colaterais estão totalmente vinculados com a disfunção erétil e outros problemas sexuais, ratificando a idade como fator de risco (CALOGERO *et al*., 2019).

Um estudo retrospectivo utilizando as informações do banco de dados de mais de 30 planos de saúde americanos, o *Integrated Health Care Information Solutions*, avaliou as 10 doenças mais prevalentes e diagnosticadas nos homens acima dos 50 anos de idade. Entre os 25 milhões de indivíduos estudados, a condição mais comum foi a HBP aparecendo em quarto lugar, ultrapassada apenas por doença arterial coronariana associada a dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica e o diabetes mellitus do tipo 2 (ISSA *et al*., 2006).

O envelhecimento e os andrógenos são dois fatores de risco que somados a mecanismos locais, fatores pleiotrópicos e luminócrinos, implicam no processo de remodelação do tecido prostático como explanado em uma revisão por Untergasser *et al.* (2005). A remodelação do tecido na zona de transição da próstata é caracterizada então por, células basais hipertróficas, secreções alteradas das células luminais que levam à calcificação, ductos obstruídos e inflamação, infiltração linfocítica com produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento de

radical de oxigênio produzindo espécies que danificam o epitélio e as células do estroma, aumento da produção de fibroblastos e fator de crescimento transformador levando à proliferação estromal (UNTERGASSER; MADERSBACHER; BERGER, 2005).

3.2.1.2 Inflamação prostática

Falando em remodelação tecidual, o papel da inflamação prostática foi evidenciado por vários autores à uma associação com a gênese da HBP, já que a próstata é um órgão imunocompetente que possui uma pequena população de células inflamatórias (linfócitos T e B, macrófagos e mastócitos) (STEINER *et al.*, 1994; GANDAGLIA *et al.*, 2013) A inflamação crônica na próstata adulta é diferente quando a próstata está com HBP comparada ao tecido saudável. Nos pacientes que estão com HBP os infiltrados mais comuns são linfócitos T CD4 +, CD19 + ou Linfócitos B CD20 + e macrófagos (VERZE; CAI; LORENZETTI, 2016).

Diante disso, os linfócitos T, macrófagos e outros linfócitos que estão presentes na próstata adulta podem causar danos para as células epiteliais e estromais e acabar estimulando a liberação de citocinas, aumentando a concentração de fatores de crescimento, promovendo um processo de remodelação anormal, caracterizado pelo crescimento fibromuscular. Essas lesões na próstata levam a mudanças estruturais que, por sua vez, levam a doenças benignas (GANDAGLIA *et al.*, 2013).

Esses estímulos levam a respostas inflamatórias na próstata do homem com idade avançada, como alterações hormonais, infecções bacterianas e virais, respostas autoimunes, refluxo urinário dentro da próstata e inflamação sistêmica associada com síndrome metabólica. O dano ao tecido dá início a um processo crônico de cicatrização de feridas onde interleucinas e fatores de crescimento induzem um mecanismo de autoestimulação caracterizado pela constante ativação de células inflamatórias, sucedendo ao aumento da próstata através da secreção de fatores de crescimento (GANDAGLIA *et al.*, 2013; VERZE; CAI; LORENZETTI, 2016).)

A hipóxia local induzida por esse aumento também é outro gatilho. As espécies reativas de oxigênio são liberadas e possibilitam a neovascularização seguidamente liberando fatores de crescimento, promovendo um ciclo vicioso que leva ao aumento da próstata (VERZE; CAI; LORENZETTI, 2016).

3.2.1.3 Vias andrógenas

Como dito anteriormente a próstata é estimulada em seu crescimento, manutenção e função secretora pela presença contínua de hormônios e fatores de crescimento. A testosterona

é o primeiro desses hormônios e seus níveis permanecem constantes entre os 25 e 60 anos, depois começam a diminuir gradualmente (MADERSBACHER; SAMPSON; CULIG, 2019).

Na puberdade masculina, os níveis de testosterona sérica são muito maiores pois nessa fase a próstata está em constante desenvolvimento/aumento, mas ao chegarem aos 18-20 anos, quando a próstata atinge o seu tamanho normal, o crescimento da próstata é interrompido mesmo com os níveis de hormônios circulantes ali presentes. Para manter esses níveis estáveis existe um equilíbrio de proliferação/morte celular, controlada pela sinalização de AR no estroma e no epitélio (APOLLONI *et al.*, 2016).

Em consequência disso, o epitélio benigno e o estroma adjacente expressam AR de forma abundante. A ação de AR no tecido da próstata é reforçada por co-ativadores que podem interagir com a porção terminal N, ligação ao DNA e/ou domínios de ligação do receptor (MADERSBACHER; SAMPSON; CULIG, 2019).

As células epiteliais luminais na HBP permanecem diferenciadas e com proliferação adormecida, sugerindo que a sinalização de AR no epitélio da próstata dispõe de sua função normal. Por sua vez, a inflamação e a reprogramação fetal interrompem a sinalização estroma-epitélio parácrina normal. Logo, mudanças no microambiente da próstata acabam permitindo que suas células epiteliais passem de um estado inerte de proliferação/morte para um estágio de crescimento anormal levando a uma super proliferação celular (ISAACS, 2008; VICKMAN *et al.*, 2020).

3.2.1.4 Atividade física, obesidade e alterações na homeostase da glicose

Uma meta-análise de 11 estudos (43.083 pacientes) indica que atividade física moderada a vigorosa reduziu o risco de HBP em 25% em relação a um estilo de vida sedentário (PARSONS; BERGSTROM; BARRETT-CONNOR, 2008). O exercício físico em certo nível pode diminuir a inflamação clínica de baixo grau e foi reconhecido como um fator central que influencia na função erétil (ESPOSITO, 2004; CALOGERO *et al*., 2019). Além de que a frequência de atividade física tem sido fortemente relacionada também à redução dos riscos de cirurgia da HBP e LUTS (PARSONS, 2007).

Estudos sugerem que as espécies reativas de oxigênio geradas pelo exercício físico são um fator mediador na prevenção do câncer de próstata. Como o envelhecimento está correlacionado com o aumento do estresse oxidativo, que por sua vez fornece um ambiente favorável para a tumorigênese, treinamento físico e corrida podem aumentar o sistema de defesa antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo e consequentemente o desenvolvimento do câncer de próstata e alterações prostáticas (REBILLARD *et al*., 2013; CAPECE *et al*., 2020).

Logo, a falta desse hábito no estilo de vida está ligada ao aumento da adiposidade, e esta, positivamente associada com maior volume da próstata. O peso corporal, o índice de massa corporal e circunferência da cintura foram todos associados em diferentes populações de estudo. Dados do estudo longitudinal de envelhecimento de Baltimore (SHOCK, 1984) também mostraram o aumento do risco de retenção urinária aguda, progressão dos sintomas urinários e de cirurgia para HBP em participantes obesos (JAVARONI; NEVES, 2012).

Outra probabilidade de aumento na próstata e desenvolvimento de HBP são alterações na homeostase da glicose. Concentrações séricas mais altas semelhantes à insulina e fator de crescimento semelhante à insulina foram associados a um risco aumentado de HBP clínica e cirurgia para HBP. Estudos mostraram aumento do tamanho da próstata, aumento de casos de cirurgia de HBP e também HBP clínica em pacientes afetados por diabetes (ITO *et al*., 2012). A energia gasta no exercício procede diretamente da glicose que se encontra armazenada na forma de glicogênio no músculo e no fígado. Logo, o exercício físico combinado a dieta e dosagens de insulina são a recomendação para redução e controle da glicose (COSTA *et al.*, 2020).

3.2.1.5 Doença cardiovascular

A doença cardiovascular (CV), incluindo doença arterial coronariana e acidente vascular cerebral, é responsável por 25% - 55% das mortes em todo o mundo (THOMPSON *et al*., 2005; CALOGERO *et al*., 2019). A hipertensão é um fator de risco bem estabelecido para CV e HBP, visto que, a prevalência de hipertensão aumenta com a idade. Embora HBP e hipertensão sejam doenças diferentes e com gravidades distintas, o envelhecimento relacionado ao seu desencadeamento pode desempenhar um papel em sua fisiopatologia. Estudos nos Estados Unidos (Terceira Pesquisa Nacional de Exame de Saúde e Nutrição) e no Reino Unido levantaram que cerca de 50% - 65% das pessoas acima de 60 anos eram hipertensos e 25% dos homens com 60 anos ou mais tinham HBP com hipertensão comórbida (BOYLE; NAPALKOV, 1995).

Outro estudo retrospectivo avaliou a gravidade dos sintomas de HBP e pressão arterial em mais de 9.800 pacientes com HBP. Os autores observaram um aumento de 0,13 e 1,60 pontos no IPSS (Escore internacional de sintomas prostáticos) a cada ano de idade e incidência medida de hipertensão, respectivamente. O risco de hipertensão também aumentou 5,0% com cada ano de idade e cada ponto IPSS. Os resultados deste estudo são consistentes para uma possível correlação fisiopatológica entre HBP e hipertensão, que pode estar relacionado ao

aumento da atividade simpática no homem idoso (MICHEL *et al*., 2004; RUSSO; URZÌ; CIMINO, 2018).

3.2.2 Sintomas, tratamento da HBP e efeitos colaterais

Com o avanço dos estudos sobre o HBP, a doença passou a ser caracterizada como uma síndrome composta por três situações, que são: a hiperplasia propriamente dita, a obstrução infravesical e as sintomatologias do trato urinário inferior, sendo que cada um destes pode provocar sintomas que se manifestam de forma independente ou integrada, como citados na tabela 1 (SLAWIN, 2003; BRESSAN, 2016).

Tabela 1. Sintomas da HBP.

Sintomas	Descrição
Sintomas de Armazenamento	Aumento da frequência urinária (polaciúria) – necessidade súbita e inadiável de urinar; Noctúria – elevado número de micções durante a noite; Urgência/incontinência urinária – causando grande desconforto e situações desagradáveis; Enurese noturna.
Sintomas de Esvaziamento	Jato fraco, bífido ou intermitente – diminuição da força e do calibre do jato urinário; Hesitação – o homem não consegue urinar mesmo com a bexiga muito cheia; Esforço miccional – provoca uma menor capacidade de contração para expulsar a urina; Gotejamento terminal
Sintomas Pós-miccionais	Tenesmo vesical – quando há sempre a sensação de esvaziamento incompleto por falta da contração das paredes da bexiga, ainda que o homem se esforce, não consegue esvaziar. Gotejamento pós-miccional – resíduos de urina que saem posteriormente já que não foi possível esvaziar a bexiga por completo.

Fonte: SILVA GONÇALVES (2019).

Para tentar medir a gravidade dos sintomas do trato urinário inferior em homens com HBP, foi adotado pela Organização Mundial da Saúde o questionário conhecido como IPSS para avaliar e quantificar os sintomas clínicos decorrentes da HBP.

Ainda que sejam identificados os sintomas e eles apareçam conjuntamente, existem tratamentos específicos para cada tipo de manifestação. Os assintomáticos ou com ligeiros sintomas da HBP, não tem perda significativa da qualidade de vida. Com o devido acompanhamento somado a medidas não farmacológicas podem até não necessitar de tratamento. Porém, a maioria dos indivíduos com HBP necessitam de terapêutica farmacológica, quando existe sintomatologia moderada ou grave e estas repercutem significativamente na qualidade de vida. Para cada situação clínica é selecionado o tratamento mais adequado, sempre levando em consideração a melhoria da qualidade de vida e os efeitos secundários do tratamento. Esse é um ponto importante uma vez que os tratamentos farmacológicos duram muitos anos.

A farmacoterapia da HBP faz uso de duas famílias de fármacos: os α1-bloqueantes, prescritos nos doentes com sintomas moderados ou graves, e os inibidores da 5α-redutase, prescritos para os doentes com sintomas também moderados a graves, contudo associados a próstata aumentada de volume. Os α1-bloqueantes pertencem ao grupo dos anticolinérgicos e devem ser prescritos quando existem queixas de inflamações do trato urinário inferior com predomínio de sintomas de armazenamento (PEREZ, 2021).

Entretanto, os inibidores da 5-fosfodiesterase (IPDE-5) que são base da terapia para disfunção erétil, do mesmo modo desempenham um papel no tratamento HBP e LUTS. IPDE-5 agem aumentando os níveis de GMPc, inibindo as ações da PDE5 resultando no relaxamento do músculo liso, que é mediado pela liberação de óxido nítrico. Medicamentos para bexiga, como o antimuscarínico Tolterodina (Detrol), também podem ser adicionados para homens que estão com sintomas de armazenamento irritativo persistente, mesmo após já terem feito a terapia de primeira linha para HBP. Essas terapias de combinação podem ser usadas para fornecer alívio de sintomas (VAN-ASSELDONK; BARKIN; ELTERMAN, 2015).

O antagonista ADR-α1 nomeado naftopidil, é estudado no Japão e na China para o tratamento de hipertensão arterial, de HBP e de disúria. O naftopidil é um antagonista seletivo dos ADR-α1. Também é um antagonista dos canais de cálcio e um agonista serotoninérgico, provocando então um relaxamento do músculo liso na próstata, na uretra proximal e no trígono vesical. Estudos sugerem que o tratamento com esse medicamento em pacientes com HBP e com hipertensão permite o controle ideal da pressão arterial dentro da faixa normal (SILVA, 2009; CHUNG; YOON; LEE, 2017).

Os α1-bloqueantes atuam mediante o antagonismo dos receptores ADR-α1, o que se traduz no relaxamento do trato de saída vesical e no aumento do fluxo urinário. Dessa forma, os fármacos α1-bloqueantes atuam de forma dinâmica no ciclo miccional (RIBEIRO,

CARVALHO; SANTOS, 2006; TEIXEIRA; SANCHES; FALCÃO, 2017). O efeito clínico do seu uso é percebido desde os primeiros dias de tratamento e se mantêm durante a terapêutica, não sendo influenciado pelo tamanho da próstata ou pelo valor do PSA (antígeno prostático específico) (DAVIDIAN, 2016).

Atualmente, os fármacos mais utilizados como bloqueadores seletivos dos ADR-α1 são nomeados como tansulosina, alfusozina, doxasozina e a silodosina, sendo este último o mais potente. A sua prescrição é recomendada a pacientes que necessitam de um rápido alívio dos sintomas, incluindo aqueles com próstatas ainda com pequenas dimensões (KAWABE *et al*., 2006; DAVIDIAN, 2016; HOSSEINABADI, 2020).

O androgênio importante que atua no nível intraprostático é a DHT. Existem duas isoformas principais que são distribuídas desigualmente ao organismo e com localizações diferentes: o tipo I está presente no fígado, pele, folículos pilosos, glândulas sebáceas e em pequenas quantidades na próstata, e o tipo II, responsável pela masculinização do feto, encontra-se na pele genital, folículos pilosos do couro cabeludo, barba, e majoritariamente, na próstata (RIBEIRO; CARVALHO; SANTOS, 2006; BANERJEE *et al*., 2018).

A finasterida e dutasterida, ao inibirem este hormônio promovem uma diminuição dos níveis de DHT a nível prostático, bloqueando o principal estímulo trófico desta glândula. Assim, por volta de seis meses de utilização pode ser observada uma diminuição progressiva do volume prostático. Essa diminuição pode atingir de 20-30% acompanhada de uma diminuição de cerca de 50% do nível sérico de PSA após este mesmo período. A finasterida inibe efetivamente a isoforma do tipo II, enquanto a dutasterida inibe ambas, I e II (LOWE *et al*., 2003; CLARK *et al*., 2004). Esse bloqueio reduz de 70 a 90% os níveis intraprostáticos da DHT, com redução do tamanho da próstata de 24%. O que leva a uma melhora dos sintomas, diminuindo o risco de cirurgia e a progressão clínica da doença (NICKEL *et al*., 2011; NICKEL *et al*., 2017).

Outros fármacos são utilizados em casos particulares de HBP para atrasar a cirurgia em sintomáticos moderados ou graves, sempre conciliando com medicações já usadas para outras patologias. Nesses casos é necessário observar a condição clínica dos pacientes, da eficácia e dos efeitos secundários da terapêutica, pois o tratamento com fármacos inibidores da 5α-redutase ou com α1-bloqueantes podem interferir na sexualidade do paciente e podem originar disfunção erétil e outros efeitos colaterais a longo prazo. Alguns fármacos anticolinérgicos utilizados para redução dos sintomas de armazenamento da bexiga como o cloreto de tróspio, a solifenacina, a oxibutinina, a tolterodina, a darifencacina e propiverina, antagonizam os receptores muscarínicos, reduzindo as contrações da bexiga (LIAO; KUO; KUO, 2013).

Todavia esses medicamentos acabam sendo contraindicados em doentes com barragem infravesical por HBP devido à possibilidade de esvaziamento vesical incompleto ou retenção urinária. Quando há sincronia de sintomas de HBP e dificuldade de ereção é proposto o tratamento com IPDE-5, habitualmente utilizado no tratamento da disfunção erétil, já mencionado (VIGNOZZI *et al*., 2013; NUNZIO *et al*., 2020). Diante deste cenário, diversas plantas medicinais têm sido avaliadas para o tratamento da HBP.

3.2.3 Plantas medicinais como tratamento alternativo da HBP

A *Serenoa repens* tem sido estudada há anos principalmente por sua baixa incidência de efeitos secundários e, apesar da escassez de estudos que comprovem a sua eficácia clínica ela continua como uma boa opção terapêutica (RIBEIRO; CARVALHO; SANTOS, 2006; NG; NG, 2017; VELA-NAVARRETE *et al*., 2018). A composição química dessa planta apresenta fitoesteróis, ácidos graxos, terpenoides e fitoestrogênios (SQUADRITO; MORGIA, 2011; STAMATIOU *et al.*, 2019). O extrato dessa planta pode atuar inibindo as enzimas 5α-redutase, aromatase, fatores de crescimento, através de efeito anti-androgênico, anti-inflamatório ou anti-edematoso (VELA-NAVARRETE, 2003; RIBEIRO; CARVALHO; SANTOS, 2006; NG; NG, 2017).

Outra espécie chamada *Pygeum africanum*, inclui na sua composição fitoesteróis, ácidos graxos, ácidos triterpenoides pentacíclicos, álcoois, ésteres de ácido ferúlico, acetogeninas lineares, N-butilbenzensolfonamida e o ácido atrárico. Os dois últimos constituintes mencionados são bem importantes na modulação da atividade anti-androgênica e na inativação do AR, respectivamente (ALVES, 2020; SALINAS-CASADO *et al.*, 2020). O seu mecanismo de ação ainda não está bem estabelecido, porém seus efeitos parecem semelhantes aos efeitos da *Serenoa repens*.

O efeito anti-inflamatório da *Pygeum africanum* está relacionado também a inibição da enzima 5α-redutase e nos níveis de prolactina, podendo impedir o acúmulo dos níveis de colesterol (PAGANO *et al.*, 2014; VÉLEZ-VINTIMILA, 2019). Estudos apontam que a utilização do extrato da casca seca preliminarmente reduz a incidência do cancro da próstata em pessoas que possuem alto risco de desenvolver a doença (ALLKANJARI; VITALONE, 2015).

Dentre espécies que apresentam propriedades terapêuticas para HBP, a *Urtica dioica* também conhecida por urtiga, é uma planta herbácea que pertence à família Urticaceae. Possui fins medicinais diversos, podendo ser usada como diurético, tratamento de distúrbios urinários, dores articulares e até queda de cabelo (ALLKANJARI; VITALONE 2015; ALVES, 2020). O

extrato da raiz de urtiga inibe a ação da globulina de ligação a hormônios sexuais, inibe ainda a atividade do fator de necrose tumoral, da enzima 5α-redutase e da aromatase (ALVES, 2020).

Outro fitoterápico de aplicação promissora em distúrbios relacionados à próstata e à bexiga é a *Cucurbita pepo*, popularmente conhecida como abóbora, membro da família Cucurbitaceae, que contém em sua composição química fitoesteróis, ácidos gordos, tocoferóis (vitamina E), proteínas, aminoácidos não essenciais (cucurbitina), hidratos de carbono e zinco (PAGANO *et al*., 2014; ALLKANJARI; VITALONE, 2015). Pela sua semelhança estrutural apresentada com a DHT, os fitoesteróis parecem ser responsáveis por justificar o efeito terapêutico das sementes de abóbora no tratamento da HBP, pois bloqueiam competitivamente a ligação da DHT aos receptores androgênicos. Propriedades diuréticas associadas às sementes também são descritas, provendo alívio e melhoria da função da bexiga bem como da uretra (DVORKIN; SONG, 2002; ALVES, 2020).

Demais estudos, apontam que o extrato refinado feito de pólen de *Brassica campestri* L. enriquecido com fitosterol também demonstraram efeitos curativos em ratos com HBP (WANG *et al*., 2015). Os principais constituintes fitoquímicos do pólen de *B. campestris* são ácidos graxos, flavonoides, compostos contendo fitoesteróis como, por exemplo, sitosterol, estigmasterol e campesterol (YANG; YANG, 1994).

Dentre os metabólitos citados acima nas espécies em questão, os fitoesteróis são comumente considerados como os contribuintes mais importantes para sua atividade farmacêutica em relação à HBP (DI SILVERIO *et al*., 1998, DREIKORN, 2002). Além das doenças da próstata, os fitoesteróis demonstraram exercer efeitos positivos não apenas sobre diferentes tipos de câncer (AWAD; FINK *et al.,* 2000), mas também em níveis de gordura no sangue e colesterol (SILVA *et al.,* 2018).

Diante do exposto, os produtos naturais são destacados como principais fontes de novos recursos terapêuticos, devido suas diferentes composições químicas principalmente do metabolismo secundário das plantas (PINHEIRO, 2020). Assim, na busca de novos tratamentos para HBP os produtos naturais são fontes promissoras, que além de possuírem a eficácia na prevenção da doença, também são acessíveis ao público, estando muitos deles inseridos na alimentação comum e diária. Do mesmo modo que as pesquisas com esses vegetais têm sido prósperas no tratamento de doenças do trato urinário, bexiga e próstata, a *A. oleracea* que também possui composições químicas semelhantes, pode ser igualmente favorável.

3.2.4 *Acmella oleracea* (L) R. K. JANSEN

*Acmella oleracea (*L.) R.K. Jansen (Família *Asteraceae*) (bas. *Spilanthes oleracea*; syn. *Spilanthes acmella var. oleracea*), é uma planta de porte herbáceo, medindo entre 30 a 60 cm de altura, com folhas compostas, opostas, membranáceas e pecioladas, inflorescências compostas de flores amarelas, caule cilíndrico e carnoso, sendo a raiz principal do tipo pivotante, com abundantes ramificações laterais (Figura 4) (NOMURA *et al*., 2013; NASCIMENTO *et al*., 2019).

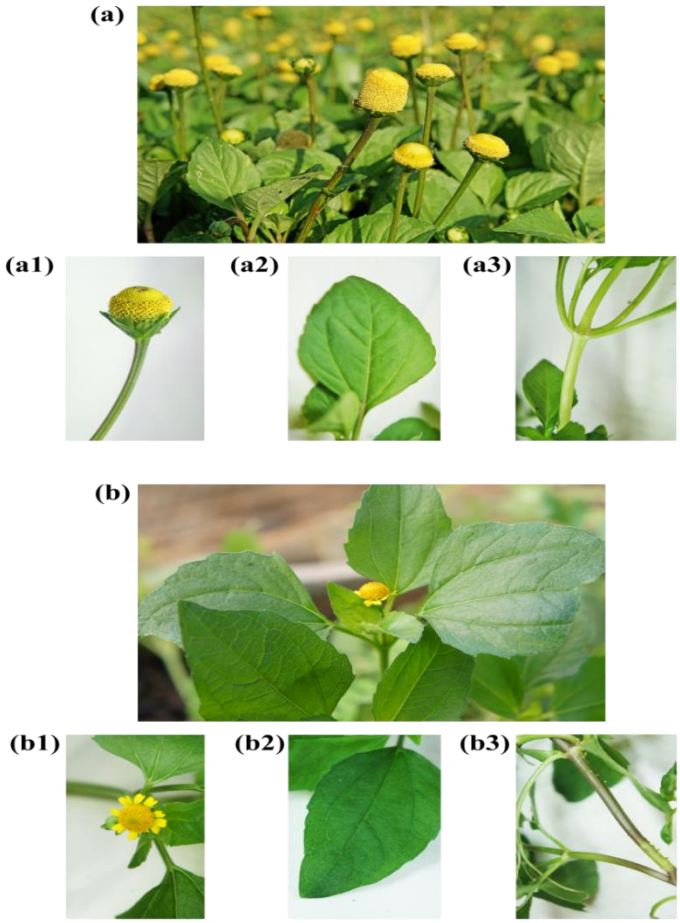

Figura 4. Flores e folhas de *Acmella oleracea*. Suas flores (a1) são amarelas e arredondadas, folhas (a2) com características ovais e dentadas, e seu caule (a3) de cor verde. Fonte: adaptada de Peretti Junior (2020).

É encontrada na Amazônia e também em regiões próximas à linha do Equador na África e na Ásia, que se multiplica por sementes ou por hastes enraizadas (FAVORETO; GILBERT, 2010; UTHPALA; TGG; NAVARATNE, 2021). Conhecida popularmente como jambu e outros nomes como, agrião-do-pará, abecedária, agrião-bravo, agrião-do-brasil, agrião-do-norte, botão-de-ouro, erva-maluca, jambuaçú e nhambu (FAVORETO; GILBERT, 2010). Suas

folhas e talos são comumente usadas como hortaliça entre os amazônidas, por serem indispensáveis na preparação de pratos típicos da região, como pato no tucupi e tacacá (iguarias originalmente indígenas). Sua propriedade como condimento está relacionada ao formigamento que suas folhas e flores causam ao serem mastigadas. Além do seu uso na culinária, o jambu tem sido bem documentado na medicina popular no tratamento de dor de dente, afecções da garganta e bucais, no tratamento de mancha de pele e outras aplicações (CARDOSO 1997; NOMURA *et al*., 2013).

Ao serem feitas as extrações de partes da planta geralmente são utilizados solventes como metanol, etanol, hexano ou CO_2, com intuito de obter o maior rendimento extrativo dos metabólitos bioativos. Estudos ratificam a influência dos diferentes métodos de extração e/ou solventes para cada parte específica da planta (folhas, flores e caules) (DIAS *et al*., 2012; RONDANELLI *et al.,* 2020). Uma abordagem analítica mais profunda permite encontrar um maior número de compostos em relação a outras análises: A cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) acoplada a analisadores de massa híbridos, como quadrupolo-tempo de voo (QTOF) via ionização por eletrospray (ESI). Essa análise pode detectar uma vasta gama de compostos químicos presentes nas plantas e fornecer sua massa exata, fórmula molecular e padrão de fragmentação (ABU-REIDAH *et al.*, 2013). É uma análise importante pois permite entender quais compostos estão protagonizando os resultados. Essa técnica permite a separação, análise e identificação de compostos em misturas complexas com alta precisão e exatidão, sendo amplamente empregada na análise de extratos brutos.

À vista disso, muitas investigações fitoquímicas dos extratos da *A. oleracea* são relatadas em vários trabalhos e seus constituintes são de diferentes grupos. As folhas e flores de *A. oleracea* podem conter aminoácidos, terpenoides, alcaloides, sendo particularmente ricos em alquilamidas (RONDANELLI *et al.*, 2020). A maioria desses compostos são as alquilamidas lipofílicas ou alcamidas, tendo diferentes hidrocarbonetos insaturados (alcenos e alcinos), tal como o espilantol, que é o principal composto isolado de muitas partes dessa planta, especialmente das flores (DIAS *et al.*, 2012; RONDANELLI *et al*., 2020).

O espilantol, uma N-alquilamida ((2E, 6Z, 8E) -N-isobutil-2,6,8-decatrienamide), é um composto bioativo também encontrado em muitas outras espécies vegetais (PRACHAYASITTIKUL *et al.*, 2013). Esse composto é importante pois exerce diferentes atividades biológicas. A atividade anti-inflamatória *in vivo* do espilantol tem sido amplamente comprovada e estudos mostram que ela não possui efeitos adversos (NOMURA *et al.*, 2013; SUNDAR *et al.*, 2015; ALONSO *et al.*, 2018).

Gupta *et al.* (2012) relataram que a atividade anti-inflamatória dos espilantes tem sido recomendada na medicina tradicional para o tratamento de reumatismo e febre, agindo também no alívio de dores articulares crônicas (NOMURA *et al.*, 2013).

O efeito anti-inflamatório também se demonstrou promissor no pré-tratamento local com alquilamidas, apoiando o potencial dessas moléculas para tratar condições de dor inflamatória aguda (DALLAZEN *et al*., 2020). Ademais, o extrato de *Spilanthes acmella* (*A. oleracea*) agiu como agente anti-inflamatório quando inibiu o edema na pata de ratos wistar albinos induzida por carragenina e protegeu da indução de contorcimento pelo ácido acético (CHAKRABORTY *et al.,* 2004). Outro estudo mostrou aprimoramento de adesão de neutrófilos, título de anticorpos hemaglutinantes e retardo na resposta de hipersensibilidade em ratos wistar machos (RAJESH *et al*., 2011; SHARMA; ARUMUGAM, 2021).

Em outro estudo, o espilantol reduziu a síntese de óxido nítrico, interleucina-8 (IL-8), fator de necrose tumoral (TNF- α), RNAm e expressão de enzimas COX. Também causou aumento na liberação de interleucinas (IL-1 β, IL-6) e TNF-α (MATTHIAS *et al*., 2007; WU *et al.*, 2008; FREITAS-BLANCO *et al.*, 2018).

Além disso o espilantol também é um forte anestésico local e vaso-relaxante (ROMÃO *et al*., 2015). Possui atividade anti-nociceptiva (RIOS; AGUILAR-GUADARRAMA; GUTIÉRREZ, 2007) e é rico em compostos fenólicos bioativos, como a cumarina (escopoletina) e triterpenoides, podendo ser atribuído a atividade antioxidante (PINHEIRO *et al.*, 2015).

Vários estudos confirmam o potencial antioxidante da *A. oleracea* sobre a redução do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), diretamente proporcional à concentração do extrato. Testes de eliminação do óxido nítrico mostraram um aumento dependente da concentração de sua atividade antioxidante (LALTHANPUII *et al.*, 2017). Em condições semelhantes, observou-se que o extrato metanólico de *A. oleracea* eliminou radicais reativos de peróxido de hidrogênio também de forma dose-dependente (LALTHANPUII *et al*, 2018).

Esta potente atividade antioxidante da *A. oleracea* pode ser também atribuída à presença de taninos, flavonoides e outros compostos fenólicos (WONGSAWATKUL *et al.*, 2008; HASANUZZAMAN *et al.,* 2012; PINHEIRO *et al*., 2015).

Um estudo investigou a atividade antioxidante e antiproliferativa de plantas dos gêneros Acmella*: Acmella alba, Acmella oleracea e Acmella calirrhiza,* das quais foram separadas em folhas, raízes, caules e flores, liofilizadas e moídas em pó fino. Esse pó das plantas foi extraído usando HCl a 1% em metanol aquoso a 90% durante 2h. A capacidade antioxidante dos extratos foi então analisada usando os ensaios DPPH e 2,2’-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-

ácido-sulfônico) (ABTS). A eliminação de radicais de cada extrato foi comparada com um padrão de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox). Ambos os ensaios revelaram que as raízes das três plantas continham menor capacidade antioxidante em comparação com folhas e flores (WEINTRAUB *et al.*, 2020).

Segundo Nomura (2013), existem outras aplicações da planta não apoiadas em evidências clínicas que fazem o uso da planta em forma de chá, onde folhas e flores são usadas para anemia e dispepsia. A decocção das folhas também é utilizada como diurético, tratamento de cálculos biliares e renais, afecções da pele e pulmonar (FAVORETO; GILBERT, 2010; NASCIMENTO *et al.*, 2019).

Estudos recentes também mostraram que a *A. oleracea* tem propriedades afrodisíacas presente nos talos, flores e folhas da planta (RODRIGUES *et al.*, 2020; COSTA TRINDADE *et al*., 2020). Em regiões do norte do Brasil, essa espécie é comercializada em feiras como um afrodisíaco feminino, no qual é visto como um estimulante sexual. Um estudo avaliou os efeitos da administração oral de extrato etanólico de flores de *A. oleracea* (EHAo) em ratos wistar durante o período de pré-acasalamento, acasalamento e pré-implantação. A pesquisa concluiu que o tratamento com EHAo, uma das formas popularmente utilizadas, é seguro nas concentrações e no tempo de tratamento estudado, pois foi capaz de influenciar o ciclo estral sem alterar a foliculogênese e a fertilidade (ROCHA *et al*., 2018).

O potencial afrodisíaco do extrato etanólico *A. oleracea in vitro* e *in vivo* também mostrou que N-alquilamidas melhoraram o potencial sexual de ratos. O efeito do extrato no padrão geral de acasalamento, ereção peniana e níveis séricos de hormônios de ratos albinos Wistar machos normais, quando comparados com citrato de sildenafil, se mostraram um bom agente estimulador sexual (SHARMA *et al.*, 2011).

Diante do potencial antioxidante, anti-inflamatório, antiproliferativo, afrodisíaco e modulador do sistema reprodutor, sugere-se que a administração do EEFAo pode atuar na prevenção de hiperplasia benigna da próstata em roedores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DO MATERIAL VEGETAL

As flores de *Acmella oleracea (*L.) R. K. Jansen foram coletadas no período da manhã entre os meses de junho e agosto de 2019 no distrito da Fazendinha- AP, sob as seguintes coordenadas Lat.: 00° 02’ 12” S Long.: 51° 06’ 39” W à 15 km de Macapá no estado do Amapá (Figura 5).

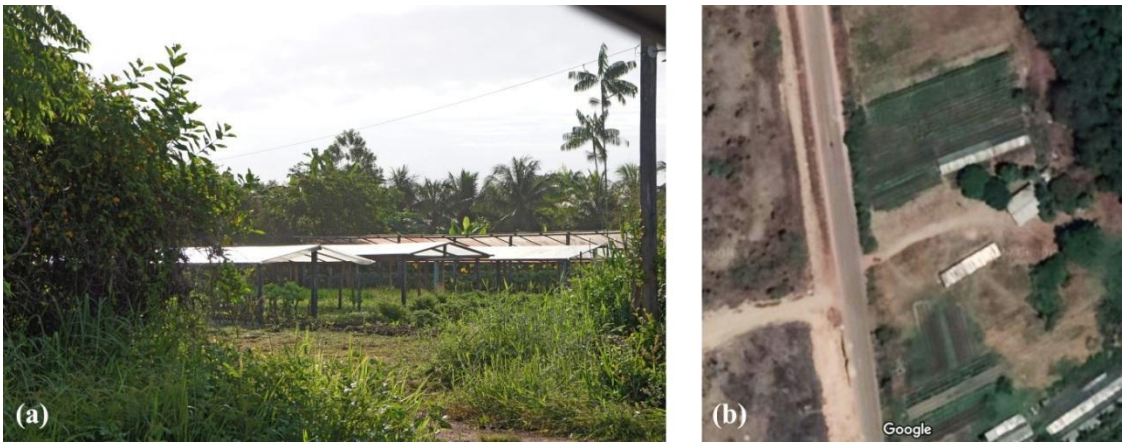

Figura 5. Área de coleta do material vegetal realizado no Distrito da Fazendinha, Macapá-AP: vista frontal (a) e imagem por satélite (b). Fonte: Peretti Junior (2020) (a); adaptado de Google Earth (acesso em 19. abril. 2020) (b).

A exsicata obtida na coleta foi identificada e depositada no Herbário Amapaense - HAMAB/Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá- IEPA. Três mudas da espécie foram entregues ao herbário, as quais foram identificadas como *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen sob o registro 05.VII.2019, P. PERETTI, 01 e 02 (Anexo A). A espécie também foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o número A0A8024 (Anexo B).

4.2 PREPARO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DAS FLORES DE *Acmella oleracea (*EEFAo)

Após coleta, as flores foram lavadas e secas em estufa microprocessada (Quimis – Q317) a 50ºC durante três dias. Após desidratadas foram pesadas e armazenadas em um frasco de vidro âmbar hermeticamente fechado (Figura 6).

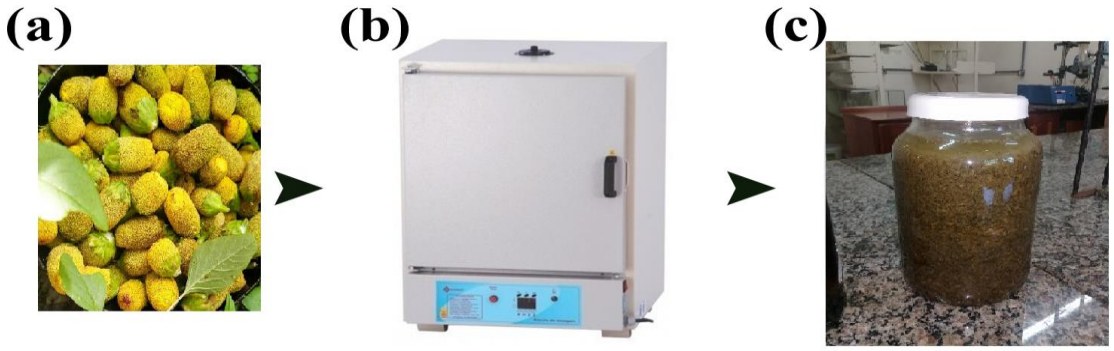

Figura 6. Etapas de preparo do material vegetal. Flores frescas de *A. oleracea* que após a coleta foram lavadas (a). As flores foram inseridas em uma estufa microprocessada a 50ºC onde permaneceram por 3 dias para a completa secagem do material vegetal (b). Secas, as partes das plantas foram separadas e armazenadas em frascos de vidro hermeticamente fechados (c). Fonte: Autor.

Estas etapas foram realizadas nos Laboratórios de Biotecnologia de Produtos Naturais (LBPN) e Absorção Atômica e Bioprospecção (LAAB) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP). Após limpas e secas as flores de *A. oleracea* foram trituradas em moinho de faca modelo (Quimis – Q298A). Em que 445g das flores moídas foram transferidas para um recipiente de vidro hermeticamente fechado contendo 3 litros de álcool a 92, 8º. O extrato bruto hidroalcóolico foi obtido por maceração durante 72 horas, este processo foi repetido até a completa exaustão extrativa, determinada pela limpidez do solvente. O macerado foi filtrado em papel de filtro e rotaevaporado a 55ºC até a total eliminação do solvente (Figura 7). Por último, o extrato final foi colocado em um dessecador contendo sílica até a remoção completa dos resíduos de solvente, sendo então determinado o seu peso e rendimento. O rendimento extrativo de 1.82 % foi obtido através da razão entre o peso do extrato bruto obtido de 8,12 g e do peso da droga vegetal seca 445,0g antes do processo de extração (Equação 1).

$$Rendimento\ extrativo\ (\%) = \frac{Peso\ do\ extrato\ bruto\ (mg)\ x\ 100\ (\%)}{Peso\ da\ droga\ vegetal\ seca\ (mg)}$$

Equação 1: Equação para obtenção do rendimento extrativo. No cálculo são utilizados os valores de peso do extrato bruto (mg) e peso da droga vegetal seca (mg).

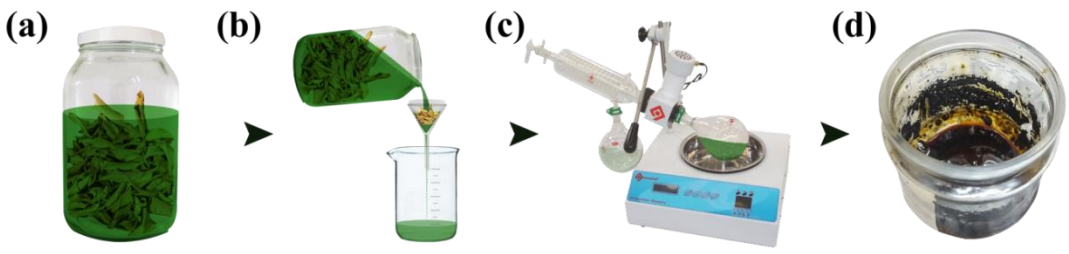

Figura 7. Etapas de obtenção do extrato etanólico das flores de *A. oleracea*. Processo de maceração das flores de *A. oleracea* realizado com álcool 92,8% durante 3 dias (a). O macerado foi filtrado com discos de papel (b). Rotaevaporação a 50ºC até evaporação máxima do solvente (c). Extrato etanólico após a rotaevaporação e dessecação com sílica (d). Fonte: Autor.

4.3 ANÁLISE DO EXTRATO POR CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (UHPLC-ESI-QTOF-MS).

O extrato foi enviado para análise na Unidade de Proteômica e Espectrometria de Massa da Rede de Infraestrutura de Apoio à Investigação e ao Desenvolvimento de Tecnologias da Universidade de Santiago de Compostela, Espanha. Foram realizadas análises por Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Espectrômetro de Massas (UHPLC-ESI-QTOF-MS). Um sistema HPLC (Elute® da Bruker) acoplado a um ionizador por *electrospray* e um detector do tipo *time off flight* (timsTOF® da Bruker). A coluna utilizada foi uma C18 (100 x 2.1mm, com o tamanho de partículas de 2,6 µm e 100 Å de comprimento de poro e um filtro in-line de 0.5µm x 0,004 de porosidade) de fase reversa da Kinetex® (Phenomenex®). Uma eluição por gradiente foi realizada com a fase móvel variando de 95% A e 5% B (Tabela 4) até as concentrações inversas, onde A: água contendo 0.1% (v/v) de ácido fórmico e B: acetonitrila contendo 0.1% (v/v) de ácido fórmico. Previamente a análise os extratos foram redissolvidos em etanol a 95% na proporção 1:140. A análise foi realizada em uma razão de fluxo 0,3 ml/min, volume de injeção de 2µl, durante 16 minutos.

Tabela 2. Tempo de eluição do gradiente no UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *A: Água contendo 0.1% (v/v) de ácido fórmico; **B: Acetonitrila contendo 0.1% (v/v) de ácido fórmico.

Tempo (min)	**%A***	**%B****
0.0	95.0	5.0
0.40	95.0	5.0
0.50	65.0	35.0
7.00	0.0	100.0
12.00	0.0	100.0
12.10	95.0	5.0
15.00	95.0	5.0

Fonte: Autor

A detecção espectrométrica de massas foi realizada com íons em modo positivo na faixa de varredura de 50-1000 m/z. A temperatura capilar foi de 200ºC, a pressão da bainha de gás foi de 2.5 Bar e a tensão das lentes capilar e tubular foram de 4500 V. A quantificação foi

baseada no conteúdo sólido dissolvido em cada extrato e na respectiva área de cada um dos compostos.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE BIOMÉTRICA

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG - Campus Samambaia) e mantidos em condições controladas de luminosidade (12 horas claro/12 horas escuro) e temperatura a 23ºC, sendo fornecidos diariamente água e ração "*ad libitum*". Os animais foram alojados em caixas de polietileno em grupos de cinco. O manejo e os experimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA-UFG 065 /19) (Anexo C). Foram utilizados 40 ratos machos *(Rattus norvegicus)*, sendo 20 da linhagem Wistar e 20 da linhagem SHR (10 animais de cada linhagem para o grupo controle e 10 animais para administração de EEFAo) (Figura 8). Para garantir a pré-instalação de HBP nos animais SHR, o experimento se iniciou quando todos os animais tinham 9 semanas de idade (YONO *et al*., 2007). Durante os 60 dias de tratamento, os animais passaram frequentemente por análise de pletismografia e foram pesados semanalmente para que as doses do EEFAo correspondessem ao peso. O grupo controle ingeriu, via gavagem, doses diárias de 100 µL de solução salina; os grupos administrados com EEFAo foram tratados via gavagem, com doses diárias de 100 mg/kg/100 µL de solução salina a 0,9%. Após período de tratamento, os animais foram pesados, anestesiados e eutanasiados por decapitação. Foram coletados próstata ventral, gônadas, rim e fígado, imediatamente pesados e devidamente preparados para as seguintes análises.

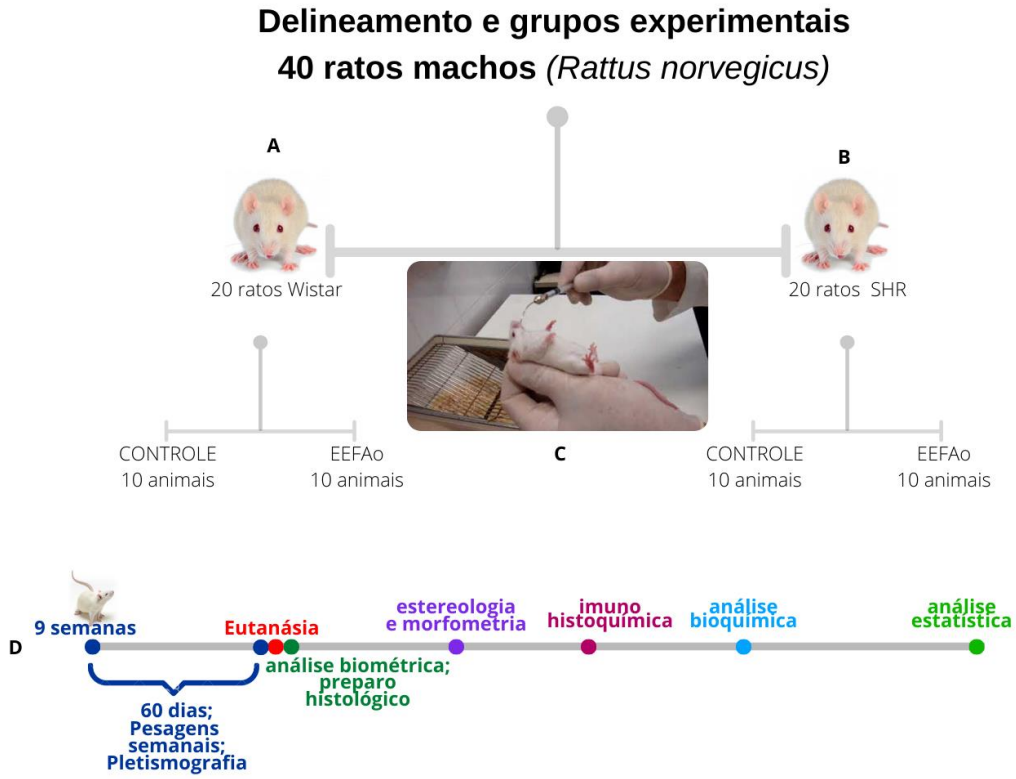

Figura 8. Delineamento e grupos experimentais. 20 animais da linhagem Wistar (10 controle; 10 EEFAo) (A); 20 animais da linhagem SHR (10 controle, 10 EEFAo) (B). Rato ingerindo EEFAo via gavagem (C); Linha do tempo mostrando a ordem em que as análises ocorreram (D). Fonte: Autor.

4.5 PLETISMOGRAFIA - AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

Durante o tratamento, os ratos foram submetidos ao acompanhamento da pressão arterial através da pletismografia de cauda, ocorrendo duas vezes por semana durante os 60 dias. Para a realização desse procedimento, os ratos foram colocados em um aquecedor à luz vermelha, logo depois foi introduzido o cuff (um manguito de conexão com a pera de insuflação ligada também a um transdutor de pressão e uma torre e mercúrio). Perto do manguito, foi acoplado um sensor de pulso em contado com a cauda, em posição anatômica determinante a artéria caudal, onde foi realizado a captação dos sinais produzidos pela pressão arterial pulsátil. Esse sistema utilizado é conectado a transdutores ligados a amplificadores de sinais BP-100 (AD Instruments) conectado ao PowerLab/400 (AD Instruments). Os sinais gráficos foram registrados pelo software LabChart7. Para se obter os registros da pletismografia, foram realizadas três aferições por animal e posteriormente, fazendo a média.

4.6 PREPARO HISTOLÓGICO PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA DE LUZ

O lobo ventral da próstata (n=5 animais por grupo) foi fixado por imersão em metacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético) por 4h a 4° C. Os órgãos foram desidratados através de uma série crescente de etanol, clarificadas em xilol, embebido em

paraplast (Histosec, Merck) e seccionado em 5 μm em um micrótomo Leica (Leica RM2155). As seções foram coradas por hematoxilina-eosina (HE), para análises gerais da próstata, e pelo ácido periódico & Schiff, para marcação da secreção glicoproteica prostática (PAS), e pelo picrossírius-hematoxilina para evidenciação de fibras do sistema colagênico. As amostras foram analisadas e digitalizadas usando um microscópio de luz Zeiss Axioscope A1.

4.7 ESTEREOLOGIA E MORFOMETRIA

As análises estereológicas foram realizadas usando o teste de multipontos de Weibel, com 130 pontos e 10 linhas (WEIBEL, 1963) para comparar a frequência relativa de cada componente do tecido prostático (epitélio, lumen, estroma muscular, estroma não muscular e colágeno), como descrito por Vilamaior *et al.* (2006). Foram escolhidos 30 campos microscópicos aleatoriamente de cada grupo experimental (seis campos por animal; n = 5). Os valores relativos foram determinados contando os pontos coincidentes na grade de teste e dividindo-os pelo número total de pontos. A análise estereológica foi realizada usando o software Image-Pro Plus v6.1 para Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, EUA). Para a quantificação da secreção glicoproteica prostática, 30 campos fotomicrográficos obtidos de lâminas coradas pela reação de PAS (n = 5 animais/grupo) foram previamente analisados e digitalizados na mesma intensidade de luz do microscópio (objetiva 10x de magnificação). A quantificação da área de secreção (μm^2) foi realizada no software Fiji (image J). Os valores obtidos correspondem à média da área de secreção PAS-positiva em relação à área total do campo de cada fotomicrografia.

Para avaliar o potencial da *A. oleracea* em reduzir a hiperplasia glandular na próstata de roedores, a frequência relativa (%) de alvéolos prostáticos hiperplásicos foi determinada. Para isso, em cada grupo experimental (n= 5 animais), foram selecionados 30 cortes histológicos de regiões centrais da próstata ventral. Em sequência, foi quantificado o número de alvéolos com morfologia normal, com hiperplasia leve e com hiperplasia intensa. A frequência relativa (%) de cada um destes fenótipos morfológicos foi obtida pela divisão do número de alvéolos normais, com hiperplasia leve ou com hiperplasia intensa pelo número total de alvéolos presentes em cada corte.

4.8 IMUNO-HISTOQUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO CELULAR

Os cortes histológicos foram desparafinizados, reidratados em série decrescente de etanol e submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato (pH 6,0) a 100ºC por 45 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS por 3 vezes de 5 minutos. Para a

visualização dos anticorpos primários foi utilizado o kit Leica BIOSYSTEMS NovoLink Polymer Detection System (RE7150-K) que incluiu etapas sequenciais intercaladas com etapas de lavagem (PBS 3 x 5 minutos), como se descreve a seguir: a atividade endógena da peroxidase, seguindo-se a isto a aplicação do Novocastra Protein Block por 5 minutos. Subsequentemente, os cortes foram incubados com o anticorpo primário para o receptor de andrógeno (Anti-AR, rabbit polyclonal IgG, N-20, Santa Cruz Biotechnology) e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, mouse monoclonal IgG2a, SC 56, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), todos em uma diluição de 1:100 e mantidos a 4ºC overnight. No dia seguinte foram incubados com o Post Primary Block por 1 hora, aplicado o polímero por 1 hora e revelados com DAB Chromogen e NovoLink DAB Substrate Buffer, contrastados com Novocastra Hematoxylin, desidratados em series crescentes de etanol, montados em Entellan (MERK) e avaliados em microscopia de luz convencional (Zeiss Axioscope).Para a quantificação de células AR e PCNA-positivas, 30 campos microscópicos (n = 5 animais/grupo; aumento de 400x) foram examinados para cada grupo experimental. Em cada campo, o número total de células positivas foi obtido como uma frequência relativa (%) em relação ao número total de células. Todas essas análises foram realizadas utilizando o sistema de análise de imagens descrito anteriormente.

4.9 TESTES BIOQUÍMICOS

4.9.1 Níveis de peroxidação lipídica (LPO)

Para a medição de LPO, foi usado o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A estimativa de TBARS foi realizada espectrofotometricamente seguindo o método descrito por Ohkawa; Ohishi; Yage (1979) com algumas modificações. As amostras foram incubadas com ácido tiobarbitúrico, ácido acético (pH 3,4) e SDS a 95 ° C por 60 min. O produto da reação foi determinado a 532 nm. Para a interpretação dos resultados, foi realizada uma curva de MDA e os dados são expressos como equivalentes de MDA em nmol / mg de proteína.

4.9.2 Níveis de proteína carbonilada (CP)

Derivados da proteína carbonila foram medidos seguindo o método descrito por Colombo *et al.* (2016) com algumas modificações. As amostras foram incubadas com DNPH preparado em 2 mol / L de HCl. A mistura foi mantida no escuro por 1 h e agitada em vórtex a cada 15 min. Tampão de desnaturação, etanol e hexano foram então adicionados a cada tubo e a mistura final foi agitada em vórtice por 40 segundos e centrifugada a 3000 x g por 10 minutos.

O sobrenadante obtido foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol-acetato de etilo (1: 1 v / v) e ressuspenso em tampão de desnaturação. A amostra foi agitada em vórtice por 5 min e foi usada para medir a absorbância a 370 nm. Os resultados são expressos em nmol de conteúdo de carbonil / mg de proteína.

4.9.3 Atividade de superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD da próstata foi determinada espectrofotometricamente. O princípio desse método é a capacidade da enzima superóxido dismutase de inibir a autoxidação da epinefrina. As amostras foram incubadas com bitartarato de epinefrina 60 mmol / L, e a intensidade da cor da amostra foi medida a 480 nm, segundo o método de Misra e Fridovich (1972) com algumas modificações. A atividade enzimática é expressa em unidades (U) de SOD / mg de proteína.

4.9.4 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT da próstata foi determinada espectrofotometricamente pela decomposição do H2O2 a 240 nm de acordo com o método descrito por Aebi (1984) com algumas modificações. As amostras foram incubadas com 86 mmol / L de H2O2 e tampão de fosfato de sódio (pH 7,0). A atividade enzimática é expressa em unidades (U) de CAT / mg de proteína. Um U de enzima decompôs assim um µmol de H2O2 / min a pH 7,0 a 25 ° C.

4.9.5 Determinação do teor de proteína

A concentração total de proteína foi medida pelo método descrito por Bradford (1976) usando BSA como padrão.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes de hipótese utilizados para determinar a significância estatística foram o teste Mann Whitney para distribuições não não-paramétricas e test-t para dados paramétricos. Todas as análises foram realizadas no software Statistica 6.0 (StarSoft, Inc., Tulsa, OK). O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$). Todos os valores foram representados pela média ± desvio padrão da média.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ANÁLISE DO EXTRATO POR CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSA (UHPLC-ESI-QTOF-MS)

Nas análises por UHPLC-ESI-QTOF-MS foram identificados picos da molécula espilantol (2E,6Z,8E)-N-isobutyl-2,6,8-decatrienamide, traços de escopoletina (7-hidroxi-6-metil cromen-2-ona) e d-limoneno (1-metil-4-(prop-1-en-2-il) ciclohex-1-eno) no EEFAo. Os espectros demonstraram tanto os picos quanto a razão m/z de cada molécula. Estes foram comparados com o espectro teórico, utilizado como referência.

Na Figura 9a observa-se o cromatograma do EEFAo, em que o pico do espilantol é identificado em 6,97 minutos idêntico ao padrão (Figura 9b). Na mesma análise também foram identificados os picos correspondentes a escopoletina e d-limoleno com tempos de retenção médio de 10,40 e 3,59 minutos, respectivamente (Tabela 3).

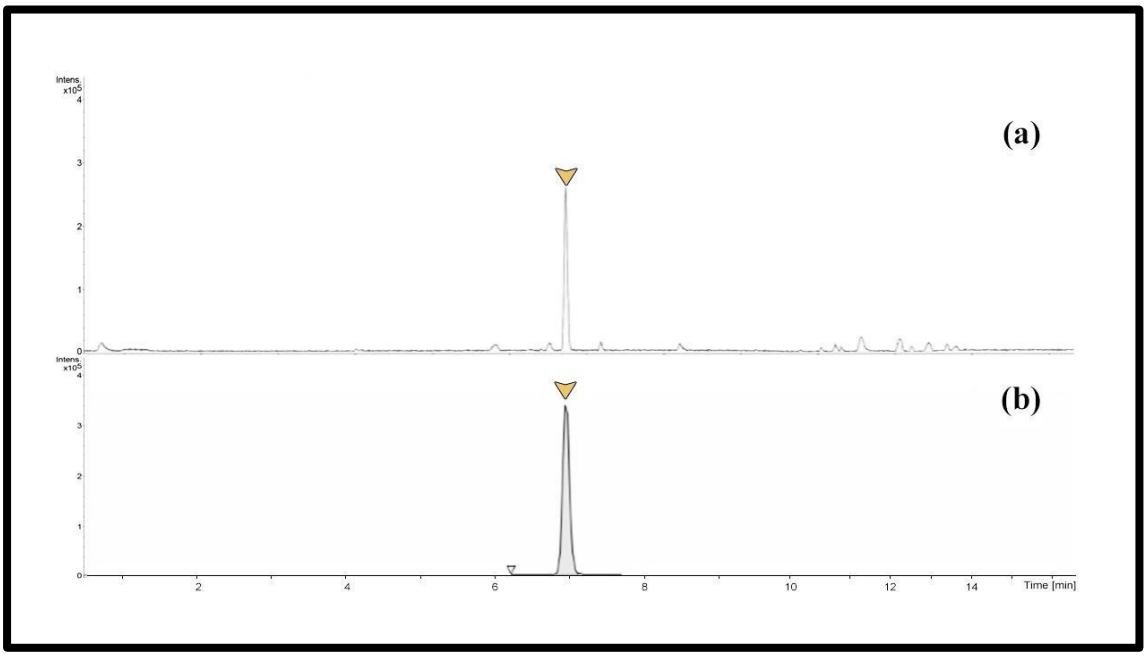

Figura 9. Cromatograma da amostra EEFAo (a) e do (padrão) (b). Tempo de retenção do espilantol obtido após análise por UHPLC-ESI-QTOF-MS confirmando a presença do metabólito secundário majoritário em 6,97 minutos. Os parâmetros da técnica cromatográfica estão descritos no tópico 3.2.5. Fonte: autor.

Além dos compostos identificados qualitativamente, também foi mensurado o rendimento do EEFAo, obtido após resíduo seco segundo (Equação 1, pág. 36) de 1,82%. Resultado este ratificado pela concentração em ppm de cada analito e pelo teor na amostra total. Outro parâmetro de extrema importância é a relação m/z (massa/carga) do padrão e do extrato serem equivalentes, o que confirma a precisão da técnica na identificação da molécula.

E por fim o mSigma, visto como ponto de qualidade de pureza da molécula o mesmo deve estar abaixo de 50 o que determina a qualidade do processo de análise possibilitando identificar a molécula quali e quantitativamente (Tabela 3)

Sabe-se que o tempo de retenção de uma molécula varia de acordo com a técnica cromatográfica utilizada. Para o espilantol, Anholeto *et al*. (2017) obtiveram um tempo de retenção de 41,9 min utilizando a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS). Bae *et al*. (2010) alcançaram um tempo de retenção de 4,97 min utilizando cromatografia líquida – com ionização por electrospray - acoplada ao espectrômetro de massas, porém com o detector de fotodiodo. Nesta metodologia utilizada por Bae *et al*. (2010), também foi utilizada uma coluna C18, porém com o diâmetro de 50 x 2.1 mm, e solvente ácido acético durante a fase móvel, estes fatores podem ter interferido no tempo de retenção entre as amostras.

Diversas técnicas analíticas têm sido utilizadas para a identificação de alquilamidas na espécie *A. oleracea*, dentre as quais cita-se a ressonância magnética nuclear, cromatografia em fase gasosa e cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas. Diferentemente destas, o método UHPLC pode ser utilizado em extratos brutos, facilitando a identificação de constituintes minoritários, além do mais, a elevada pressão exercida nas amostras durante o método, facilita a identificação e reduz o tempo de trabalho (MOLINA-TORRES; GARCIA-CHAVEZ; RAMIREZ-CHAVEZ, 1999; BAE *et al.* 2010; POKHREL; DUBEY, 2013; NAHAR; ONDER; SARKER, 2019).

Tabela 3. Dados quantitativos da amostra de EEFAo a 92,8%. Os dados foram obtidos por UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS, sendo feita a identificação dos constituintes majoritários espilantol (N-isobutilamida-2E,6Z,8E-decatrienóico) e traços de escopoletina (7-hidroxi-6-metil cromen-2-ona) e d-limoneno (1-metil-4-(prop-1-en-2-il) ciclohex-1-eno).

Amostra	Rendimento Global (%)	Composto	Tempo de retenção (min)	Área	m/z mensurado	m/z padrão	m Sigma	Teor (%)	Concentração em ppm ± DP
		espilantol	6,97	29159007	222,1847	222,1847	9,75	97,7	50 ±15
		escopoletina	3,59	17808	193,0494	193,0495	23,2	1,53	30±6
EEFAo 92,8%	1,82								
		d-limoneno	10,40	9013	137,1325	137,1325	37,5	0,77	15±0,0

m/z: Razão carga/massa; min: Minutos; Fonte: Autor

Na tabela 3 observa-se o espilantol como metabólito majoritário no EEFAo, com teor de 97,7 %. Na literatura, várias análises de extrato de *A. oleracea*, apresentam o espilantol como composto principal da planta, principalmente quando extraídos das flores (ZELIOLI *et al.*, 2015; ALONSO *et al.*, 2018; PERETTI *et al*., 2021).

Outros autores que investigaram a composição química de folhas, flores e caules de jambu cultivados em sistemas hidropônico e convencional, também caracterizaram a determinação de 45 compostos, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides glicosilados, alquilamidas e ácidos graxos, por análise HPLC. Entre os 45 metabólitos identificados, 14 eram alquilamidas. O pico 37 (tempo de retenção: 8,38 min, m / z 222,1869 [C 14 H 23 NO + H] +) foi o pico mais intenso nos cromatogramas positivos de extratos de *A. oleracea* e também foi caracterizado como espilantol (NASCIMENTO *et al.*, 2019).

Outro estudo recente identificou pelo método UHPLC-DAD-ESI-MS / MS a presença de N-alquilamidas no extrato comercial de *A. oleracea.* Foram identificadas a presença de nove N-alquilamidas, em que o pico mais intenso em todos os cromatogramas pertenceu ao composto 6 (Rt~3,10 min) identificado como espilantol ((2E, 6Z, 8E) -N-isobutil-2,6,8-decatrienamida). Este processo foi realizado monitorando os solventes mais comumente usados (metanol, etanol, solução salina e água) durante 120 min. Os resultados obtidos indicaram que o espilantol e o homospilantol foram as N-alquilamidas mais estáveis apresentadas no extrato (SAVIC *et al.*, 2020).

Esta espécie é rica em compostos fenólicos e alquilamidas, moléculas que possuem grande afinidade por solventes como o etanol e metanol. O teor do espilantol aqui obtido (97,7 %) corrobora com o estudo de Bae *et al*. (2010) que obteve um teor de 97% utilizando como técnica extrativa a maceração em etanol a 75 %. Estes dados ratificam que o solvente etanólico apresenta melhor afinidade extrativa não apenas para as alquilamidas, mas também para outras moléculas quando comparado ao solvente aquoso (DIAS *et al.*, 2012). Peretti *et al.* (2021) ratifica esta informação ao observar que o extrato aquoso extrai em maior quantidade alquilamidas (espilantol) e que os extratos hidroetanólicos arrastavam além destas outras moléculas de diferente polaridade. Esta interação entre solvente e molécula supostamente interfere na maior concentração de espilantol em solução hidroetanólica (LAPORNIK; PROSEK; WONDRA, 2005).

Podemos justificar o bom rendimento e concentração de espilantol encontrados por três motivos, o clima e solo favoráveis para o cultivo da *A. oleracea*; o período de plantio e coleta das amostras; e o ambiente de semeadura. Segundo Cardoso; Garcia (1997) o clima amazônico com temperaturas e umidade relativa do ar elevada, assim como o solo umidificado, são fatores

favoráveis para o crescimento da planta. Este ambiente estimula o desenvolvimento sadio e consequentemente o aumento dos seus metabólitos. Outro fator favorável foi o período de plantio e coleta das mudas, ocorrido entre os meses de abril e maio, que segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (2019) foram os meses com os maiores índices pluviométricos do ano de 2018. O período de chuvas gera um estresse hídrico e aumenta a umidade do solo, fator favorável para o desenvolvimento das mudas. Estas plantas até então estudadas foram obtidas em solos e regiões de plantio aberto. Estes fatores geram um ambiente de estresse pelo contato com outras espécies de vegetais, animais e pragas, estimulando mecanismos de defesa natural, o que pode elevar os índices de metabólitos secundários.

Após confirmação do teor de espilantol e demais constituintes, foram realizados procedimentos *in vivo* diante do modelo animal proposto, onde o primeiro ensaio diz respeito a confirmação da condição patológica do modelo animal estudado.

5.2 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

Os resultados mostraram aumento da pressão arterial sistólica acima de 200 mmHg nos SHR durante todo o período de tratamento (Figura 10), embora os grupos SHR e W apresentem diferenças significativas o tratamento não alterou o perfil da pressão ao longo das semanas.

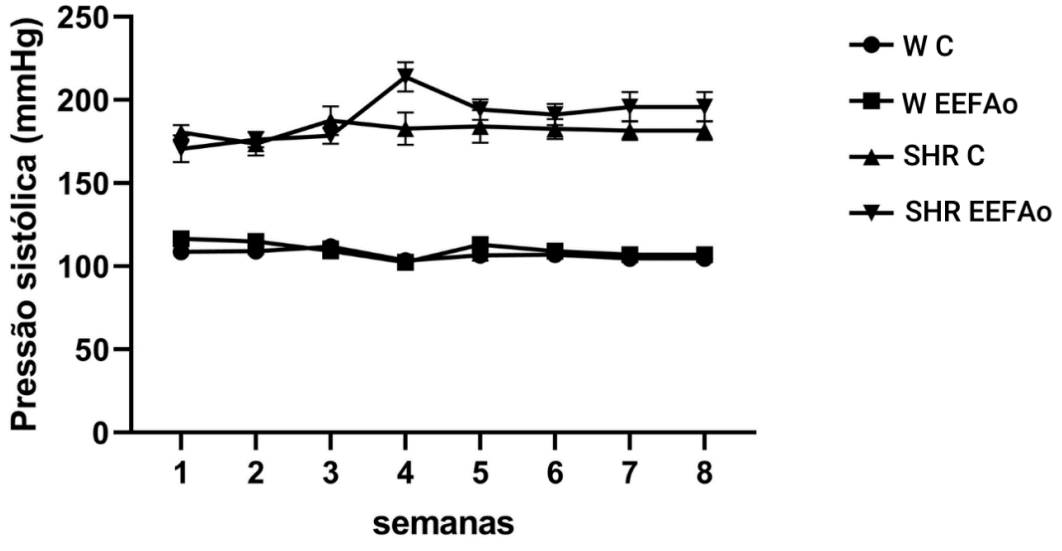

Figura 10. Pressão arterial sistólica dos grupos SHR e W. Valores da pressão arterial sistólica de ratos de todos os grupos das linhagens SHR e Wistar, foram aferidos semanalmente por pletismografia de cauda. Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média. C = controle; EEFAo = Extrato etanólico das flores de *A. oleracea*. Fonte: Autor.

O SHR é o modelo mais estudado na literatura, devido a sua fisiopatogenia semelhante com a hipertensão essencial (primária) do homem. Esses animais apresentam um nível de

pressão considerado como hipertensão espontânea entre a 7ª e a 15ª semanas, levando o animal a uma progressiva hipertrofia cardíaca (SMIRK; HALL, 1958; YAMORI, 2013).

Essa hipertrofia cardíaca leva a uma diminuição do fluxo sanguíneo prostático nos SHRs manifestando anormalidades morfológicas glandulares na próstata ventral (GOLOMB *et al*., 2000; YONO *et al.*, 2007). Também revela altas taxas de proliferação das células do epitélio prostático quando comparado a Wistar (MATITYAHOU; ROSENZWEIG; GOLOMB, 2003; SHIMIZU *et al.*, 2021). Assim sendo, nossos estudos mostraram através da pletismografia que os animais de fato estavam hipertensos.

As análises histopatológicas confirmaram que o extrato teve efeito relevante na próstata dos animais, estes resultados sugerem que a melhora se deu através de mecanismos independentes da pressão arterial. Considerando o desenvolvimento espontâneo da HBP o extrato atenuou as características da patologia com resultados promissores. A evolução dessa doença nos SHRs é semelhante ao que acontece nos homens.

Sabe-se que o envelhecimento e a hipertensão associada causam aterosclerose nos vasos sanguíneos do trato urinário inferior, levando ao desenvolvimento da HBP e também aumento benigno da próstata (HAGA *et al.*, 2018; MADERSBACHER; SAMPSON; CULIG, 2019). Clinicamente, pacientes idosos com HBP necessitam tomar vários medicamentos, como anti-hipertensivos. Sendo a hipertensão uma condição crônica, a maioria dos pacientes tomam medicamentos com frequência por muitos anos, levando a efeitos colaterais (ITO *et al.*, 2013).

Rodrigues *et al*. (2007) relata que a coexistência de HBP e hipertensão arterial sistêmica ocorre em quase 25% dos homens com idade superior a 60 anos e o tratamento farmacológico da HPB com bloqueadores ADR-α1 pode ser benéfico para ambas as patologias. Estudos como esse sempre objetivam assegurar a eficácia e segurança de medicamentos em pacientes hipertensos com sintomas prostáticos. O EEFAo, mesmo não tendo um efeito anti-hipertensivo aqui neste estudo, apresentou um potencial anti-hiperplásico mostrando ser um possível fitoterápico favorável para homens que convivem com ambas anomalias. As análises a seguir sugerem que o extrato não se apresentou tóxico aos animais.

5.3 BIOMETRIA

Nas análises biométricas do corpo e órgãos reprodutivos dos grupos SHR e W, observou-se um aumento significativo apenas no peso absoluto e relativo do testículo no grupo W EEFAo (Tabela 4). Diante dos resultados sugere-se que o EEFAo de alguma forma pode interferir no sistema reprodutor de ratos machos da linhagem Wistar.

Tabela 4. Dados biométricos dos ratos SHR e W de todos os grupos experimentais.

	Grupos			
	SHR C	**SHR EEFAo**	**W C**	**W EEFAo**
Peso corporal (g)	326,1 ± 19,1	322,2 ± 24,3	392,7 ± 41,5	378,8 ± 25,7
Peso da próstata ventral (PV) (g)	0,40 ± 0,10	0,48 ± 0,10	0,78 ± 0,20	0,68 ± 0,20
Peso Relativo da PV ($x10^3$)	1,2 ± 0,3	1,5 ± 0,2	2,0 ± 0,7	1,8 ± 0,6
Peso do Testículo (g)	3,3 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,3 ± 0,3	3,8 ± 0,5*
Peso Relativo do Testículo ($x10^2$)	1,0 ± 0,001	1,0 ± 0,001	0,8 ± 0,09	1,0 ± 0,14*

Os valores correspondem à média ± desvio padrão da média. *Análise estatística baseada no teste-t; comparando-se SHR C e SHR EEFAo, W C e W EEFAo (n = 10 animais por grupo; $p \leq 0,01$). C = controle; EEFAo = Extrato etanólico das flores de *A. oleracea.* Fonte: Autor.

O resultado mais próximo encontrado na literatura, obteve um resultado diferente, foi o estudo de Rocha *et al.* (2018), feito com Wistar fêmeas em que avaliaram a toxicidade reprodutiva do extrato hidroetanólico das flores de *A. oleracea* (EHAo) tratadas por via oral durante 21 dias consecutivos, nas doses 88,91 mg / kg e 444,57 mg / kg de EHAo. Os resultados mostram nenhuma alteração macroscópica do sistema vital e órgãos reprodutivos que poderiam sinalizar lesão causada pelo EHAo, considerando parâmetros de cor, textura, tamanho e forma. Os resultados histopatológicos dos ovários ratificam que o tratamento com EHAo foi incapaz de promover mudanças estruturais.

Outro resultado, não significativo, porém relevante foi que o tratamento com EEFAo na dose de 100 mg / kg não alterou o peso corporal em nenhum dos grupos SHR e W. Rocha *et al.* (2018) também não identificaram diferença significativa no ganho de massa corporal em ratos fêmeas wistar.

A carência de estudos dos efeitos da *A. oleracea* na próstata nos levou a observar se esse extrato já havia sido investigado sob o sistema reprodutor. Sousa *et al.* (2019a) obtiveram resultados diferentes ao avaliarem a ação do extrato hidroetanólico das flores de *A. oleracea* (EHFAo) no desempenho reprodutivo e desenvolvimento embrionário de peixe zebra. Os autores observaram que os grupos em que machos e fêmeas receberam EHFAo e espilantol, a desova foi interrompida, enquanto nos grupos em que apenas as fêmeas foram tratadas, a desova ocorreu durante os 21 dias. Na avaliação histopatológica das gônadas, foi possível observar que a porcentagem de gametas maduros tanto masculino como feminino foi significativamente reduzida. Esse estudo sugere que o tratamento da geração parental de peixe-zebra com EHFAo e espilantol causou graves alterações nas gônadas e na fertilidade.

Em outro estudo do mesmo grupo foi avaliado o efeito do extrato hidroetanólico de *A. oleracea* sobre o desempenho reprodutivo (parental) e o desenvolvimento embrionário (geração F1) de peixes-zebra, nas concentrações de 50, 100 e 200 μg / L. A histopatologia das gônadas parentais após 21 dias de exposição ao EHFAo revela poucas alterações nos ovários e testículos, não prejudicando a reprodução. O estudo mostrou que o tratamento não causou alterações prejudiciais nos progenitores em relação às suas gônadas ou fertilidade (SOUZA *et al*., 2019).

Atentamos a outra planta da mesma família da *A. oleracea*, A *Artemisia Judaica* (Asteracea). Nesse estudo de Al-trade *et al.* (2020) foi analisado o efeito do oléo essencial e extrato etanólico na próstata de Wistar e no final do experimento não houveram mudanças significativas de peso entre os grupos, compatível com nossos resultados, sugerindo que espécies vegetais dessa família não têm efeito tóxico na próstata de roedores.

Por ser um dos primeiros estudos direcionado ao efeito do extrato de *A. oleracea* à próstata de roedores, não foi possível comparar nossos resultados com estudo em ratos machos. O resultado do tópico a seguir fortalece nossos achados quanto ao grau de toxicidade do EEFAo.

5.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO E RIM

As análises histopatológicas de rim e fígado mostram que o EEFAo não causou efeitos tóxicos no fígado e rins de animais SHR e W (Figura 11). Ademais, o EEFAo parece ter efeitos positivos sobre a morfologia desses órgãos em SHRs, visto que diminuiu regiões de edema tecidual nestes animais.

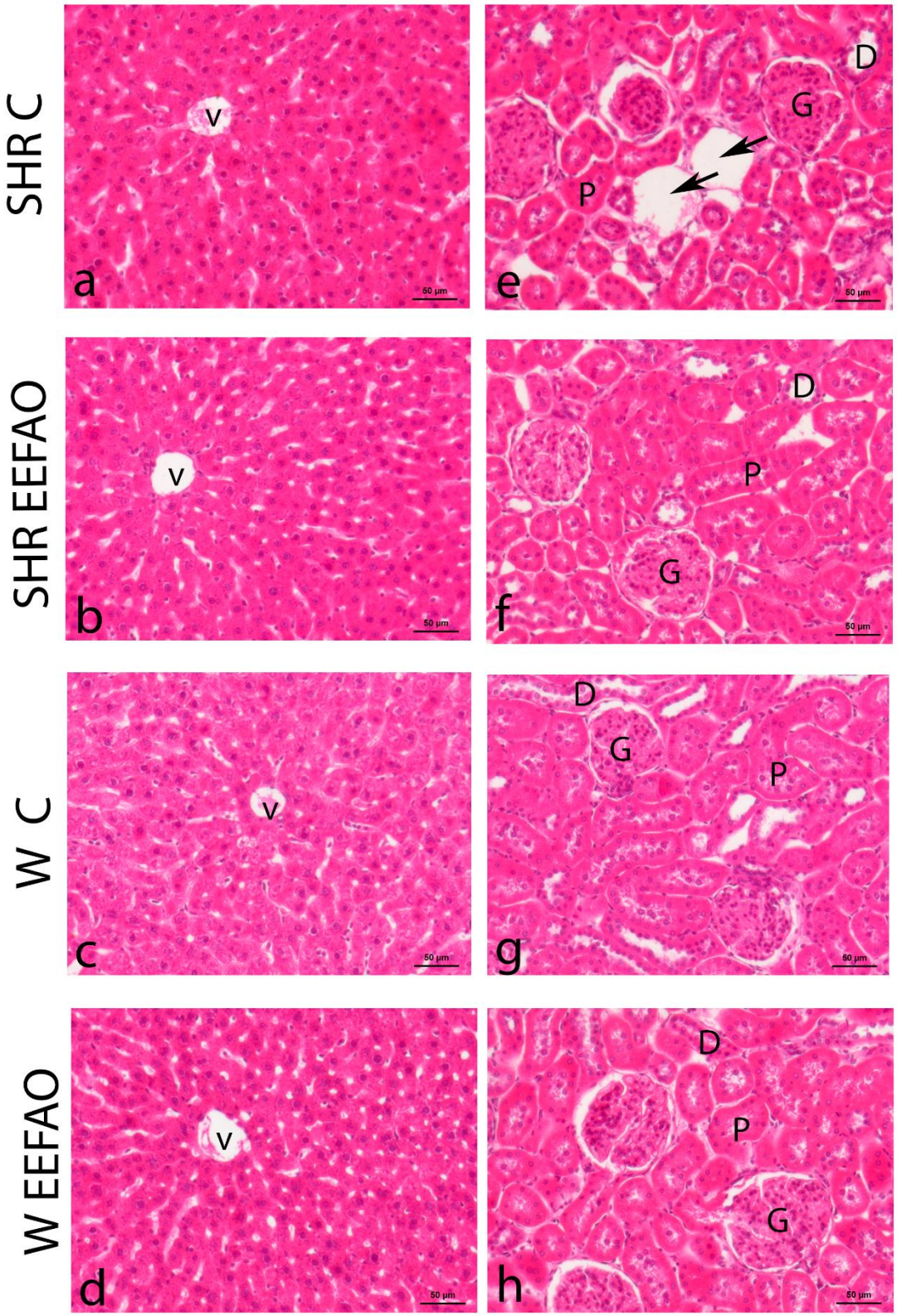

Figura 11. Análise histopatológica do fígado e rim dos grupos SHR e W. Cortes histológicos corados pelo HE. Fígados (a, b, c e d) e Rins (e, f, g e h). Aspectos morfológicos do fígado de ratos tratados com EEFAo em ambas as linhagens (b e d), se assemelharam aos seus respectivos grupos controles (a e c). Da mesma forma, não foram observados sinais de toxicidade nos rins dos roedores tratados SHR e Wistar (f e h). Ademais, animais SHR tratados não apresentaram vasos linfático edemaciados típicos de SHR controles (setas); v = veia centrolobular do fígado; G = glomérulo renal D = túbulo contorcido distal; P = túbulo contorcido proximal. Fonte: Autor.

O conceito de “natural” é o que nos leva à busca de estudo que avaliem o efeito de plantas medicinais, porém, vale salientar que as plantas também podem ser altamente tóxicas. Muitas plantas já foram utilizadas antes sem restrição e posteriormente estudo científicos comprovaram sua toxicidade, a isso, devemos a importância de fazer primeiramente estudos químicos, farmacológicos e toxicológicos minuciosos (RITTER *et al*., 2002).

Nossos resultados corroboram com Nomura *et al.* (2013) que avaliaram a toxicidade do extrato etanólico de jambu nas concentrações de 5, 50, 500 e 5000 mg/Kg por via intraperitoneal em camundongos, cujas doses de 5, 50, 500 mg/Kg não demonstraram nenhum sinal ou sintoma de toxicidade ou morte. Nesse estudo apenas a dose de 5000 mg/Kg causou alterações respiratórias e convulsão, muito superior às outras doses, assegurando também que a dose de EEFAo usada nesse estudo (100 mg/Kg) não entra nessa margem de toxicidade.

Antes disso, Chackraborty *et al*. (2004) e Sharma *et al*. (2011), também não observaram qualquer efeito colateral, mudança de comportamento ou mortalidade na concentração de 3000 mg/kg de extrato aquoso de partes aéreas de *Spilanthes acmella* e 2000 mg/Kg de extrato etanólico de flores de *A. oleracea* administrado por via oral em ratos, respectivamente.

Rocha *et al*. (2018) ao avaliarem a toxicidade reprodutiva em Wistar fêmeas, verificaram que de acordo com os valores médios da função renal, os níveis de ureia e creatina não apresentaram diferença significativa nos parâmetros bioquímicos. Assim como para os valores médios da função hepática, a atividade das enzimas que qualificam a integridade do fígado não apresentou diferença após as fêmeas terem sido submetidas ao tratamento com o extrato etanólico de *A. oleracea*.

Estes resultados preliminares de toxicidade para o experimento em questão foram importantes quanto a confirmação de sua segurança e eficácia.

5.5 MORFOLOGIA E ESTEREOLOGIA

A análise histológica revelou que os grupos SHR C e SHR EEFAo apresentaram HBP caracterizada por extensas dobras do epitélio direcionadas para o lúmen glandular (Figura 12a). Os animais SHR EEFAo tiveram atenuação do fenótipo hiperplásico, com redução da frequência relativa do compartimento epitelial e aumento no compartimento luminal quando comparado ao SHR C (Figura 12b, Tabela 5). Quanto aos outros compartimentos avaliados em SHR C e SHR EEFAo, não foram observadas alterações significativas (Figura 12, Tabela 5). No grupo W, os resultados entre C e EEFAo assemelharam-se, portanto, não houve diferença estatística significativa (Figura 12, Tabela 5).

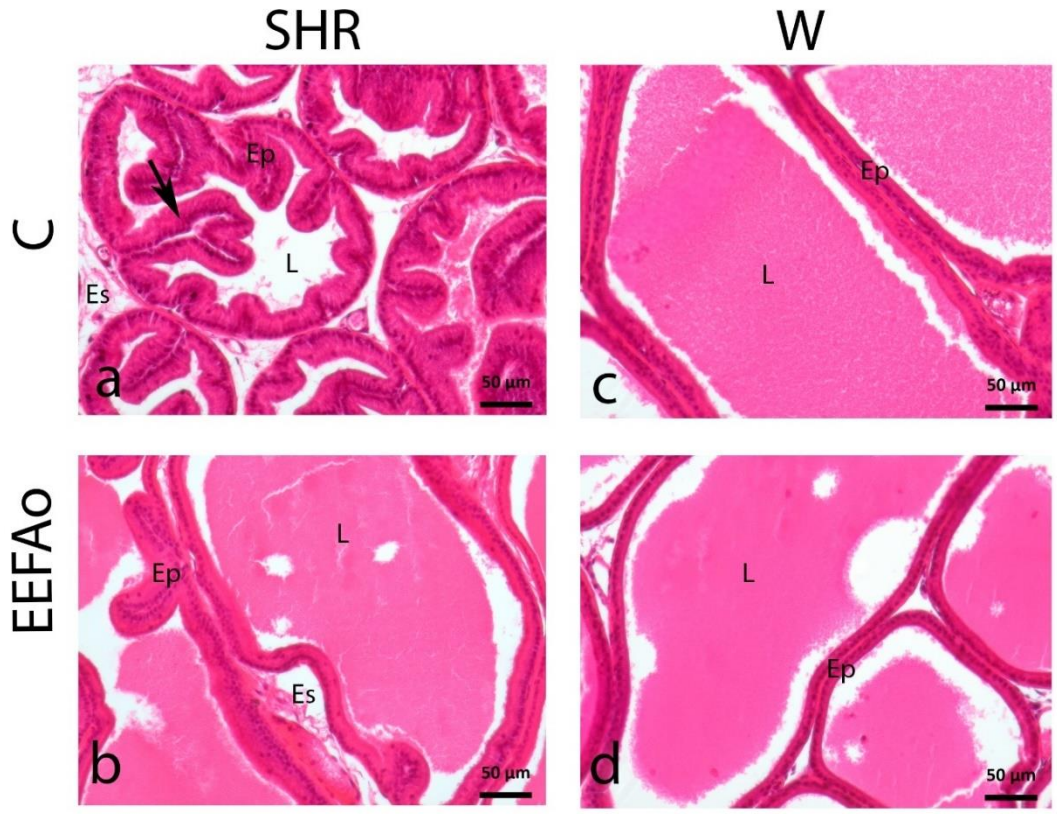

Figura 12. Histologia da próstata ventral dos ratos SHR e W. Aspectos morfológicos da próstata ventral dos grupos SHR e W. (a) No grupo SHR a próstata apresentou características hiperplásicas típicas, com o epitélio (Ep) formando extensas dobras (seta) direcionadas para o interior do lúmen (L). Estroma (Es). No grupo SHR EEFAo (b) ocorreu redução de dobras no compartimento epitelial e aumento no compartimento luminal. Não foram observadas alterações histológicas na próstata ventral do grupo W. C = controle; EEFAo = Extrato etanólico das flores de *A. oleracea*. Fotomicrografias em aumento de 200x, coloração hematoxilina-eosina. Fonte: Autor.

Tabela 5. Dados estereológicos obtidos após análise da próstata ventral de ratos SHR e W após o tratamento.

	SHR		**W**	
	C	**EEFAo**	**C**	**EEFAo**
Epitélio (%)	50,2 ± 7,7	33,2 ± 11,1*	28,2 ± 5,1	27,3 ± 6,2
Lúmen (%)	23,8 ± 8,0	43,6 ± 11,7*	58,8 ± 7,8	59,5 ± 8,1
Estroma muscular (%)	5,7 ± 3,1	5,0 ± 2,3	3,8 ± 2,6	3,3 ± 2,3
Estroma não muscular (%)	20,3 ± 6,2	18,3 ± 5,3	9,2 ± 3,8	9,9 ± 5,7

Os valores correspondem a média ± desvio padrão da média. As análises estatísticas foram baseadas no Teste-t (n = 30 campos para 5 animais por grupo). Já os asteriscos (*) representam as diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais, sendo * ($p \leq 0{,}0000001$). C = controle; EEFAo = Extrato etanólico das flores de *A. oleracea*. Fonte: Autor.

Na análise histopatológica da glândula ventral observamos que o grupo SHR C apresentava alvéolos prostáticos com aspecto de hiperplasia intensa em sua maioria (Figura 13, f), com diminuição significativa dessa característica no grupo tratado com EEFAo (Figura 13,

f). Houve aumento significativo de alvéolos normais (Figura 13, d) e com hiperplasia leve (Figura 13, e) no SHR EEFAo, indicando atenuação no padrão de estratificação epitelial e projeções papilares, refletindo no aumento da luz do alvéolo. No grupo W não houve diferença entre alvéolos normais e com hiperplasia leve, porém o tratamento com EEFAo provocou uma diminuição de alvéolos com grau de hiperplasia intensa (Figura 13, i).

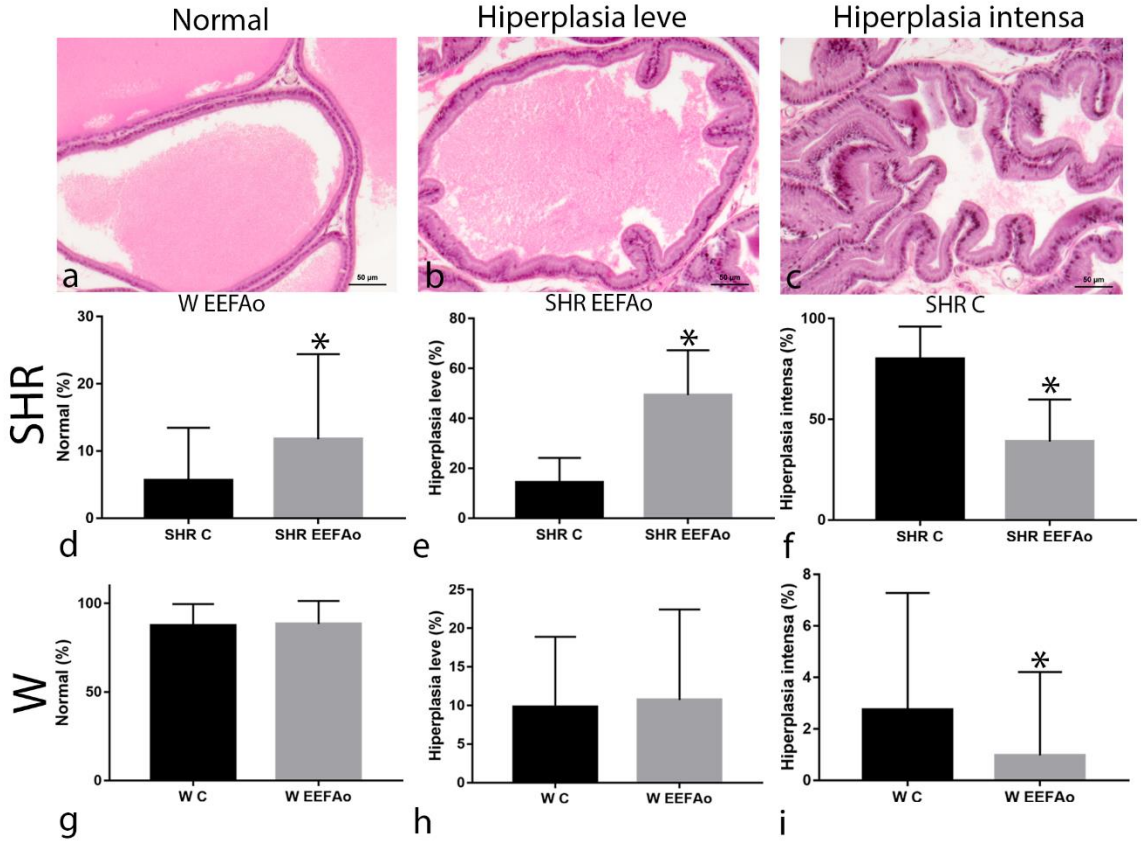

Figura 13. Análise histopatológica da próstata ventral de roedores SHR e W – Grau de hiperplasia. Fotomicrografias a (W EEFAo), b (SHR EEFAo) e c (SHR C) ilustram os fenótipos morfológicos representativos observados para alvéolos normais, com hiperplasia leve e hiperplasia intensa, respectivamente. (d-i) Representação gráfica da frequência (%) de alvéolos normais, com hiperplasia leve e intensa nos diferentes grupos experimentais. Os valores mencionados correspondem à média e o desvio padrão da média. As análises estatísticas foram baseadas no Teste-t, para dados paramétricos e no teste de Man-whitney para dados não-paramétricos, sendo o * ($p \leq 0,05$). C = controle; EEFAo = Extrato etanólico das flores de *A. oleracea.* Fonte: Autor.

A análise pelo método de picrossírius-hematoxilina indicou que o EEFAo reduziu o acúmulo de fibras de colágeno no estroma da próstata ventral de animais SHR. Contudo, a frequência destas fibras não se alterou nos animais W (Figura 14).

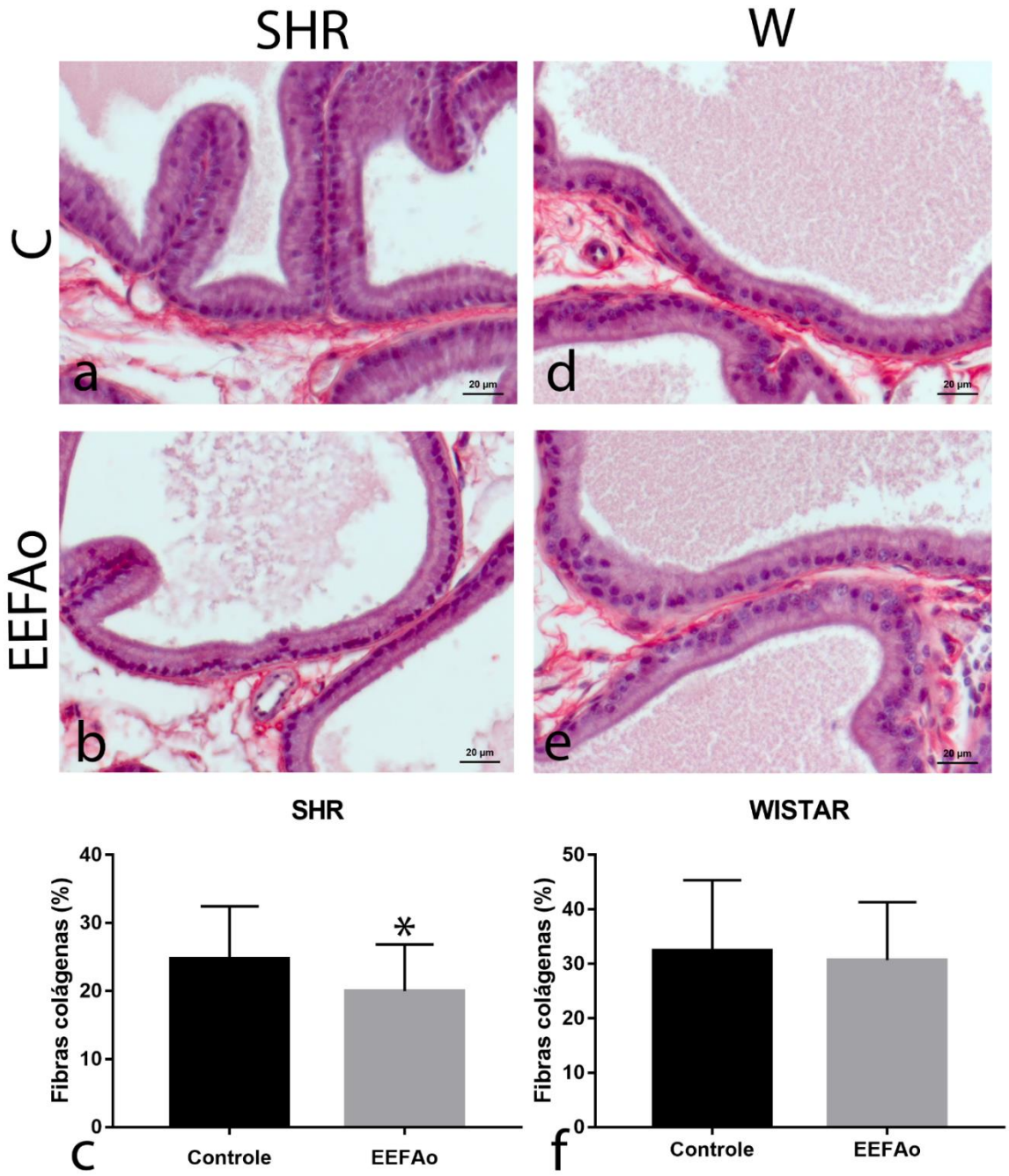

Figura 14. Análise do estroma da glândula prostática – fibras colágenas. Cortes histológicos da próstata ventral de roedores SHR (a, b) e W (d, e) corados pelo método Picrosirius. Representações gráficas da frequência relativa (%) de colágeno nos grupos SHR (c) e W (f). Os valores mencionados correspondem à média e o desvio padrão da média. As análises estatísticas foram baseadas no Teste-t, para dados paramétricos e no teste de Man-whitney para dados não-paramétricos, sendo o * ($p \leq 0,05$). C = controle; EEFAo = Extrato etanólico das flores de *A. oleracea.* Fonte: Autor.

Na quantificação de secreção prostática, a área total de secreção da próstata ventral apresentou alterações significativas nos grupos tratados (Figura 15). No grupo SHR EEFAo (b) foi verificado um aumento significativo da área de secreção da próstata, enquanto no grupo W EEFAo (e) houve uma diminuição da área de secreção.

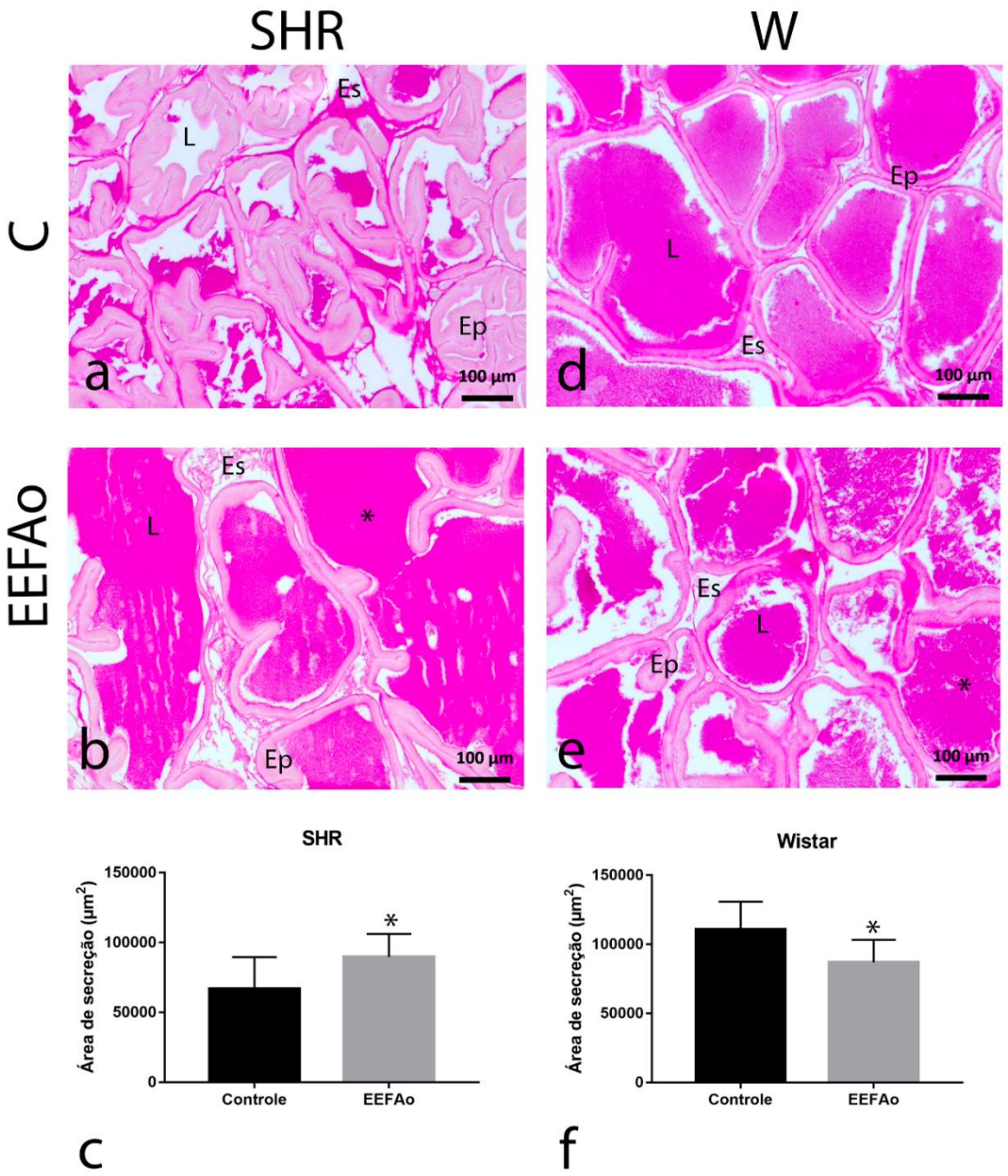

Figura 15. Quantificação da área de secreção PAS-positiva na próstata ventral de ratos SHR e W. (a-b; d-e) Cortes histológicos da próstata ventral corados pelo ácido periódico & Schiff (PAS). Os dados qualitativos e quantitativos (c, f) demonstram que ocorreu um aumento secreção PAS-positiva (*) em SHR EEFAo, e uma diminuição em W EEFAo. Epitélio (Ep), lumen (L), estroma (Es). (c-f) Representação gráfica da área de secreção PAS-positiva. Os valores correspondem a média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram baseadas no Teste-t (n= 30 campos para 5 animais por grupo). Já os asteriscos (*) representam as diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais, sendo * ($p \leq 0{,}00004$). C = controle; EEFAo = Extrato etanólico das flores de *A. oleracea*. Fonte: Autor.

Neste estudo os animais começaram a ser tratados com 9 semanas de idade para garantir que o tratamento iniciasse antes da instalação da HBP e assim avaliar se o EEFAo previne o desenvolvimento da patologia. Morfologicamente, as análises revelaram a existência de hiperplasia na próstata ventral (PV) dos animais SHR, confirmando que o mecanismo de instalação da HBP havia iniciado.

Foi observado que nos animais SHR C, os aspectos morfológicos da próstata ventral eram característicos de hiperplasia, enquanto que no grupo SHR EEFAo houve atenuação desses aspectos, sugerindo então que EEFAo pode agir prevenindo e/ou atenuando esses fatores.

Na literatura científica há uma escassez de estudos utilizando extratos das partes aéreas de *A. oleracea* ou da mesma família sobre o modelo de HBP, porém existem outros extratos que são bem documentados que agem na redução de sintomas associados a HBP e LUTS.

Um extrato de planta da mesma família da *A. oleracea*, é o extrato enriquecido com silimarina (SEE), obtido a partir de *Silybum marianum* (Asteraceae). O estudo de Gioti *et al.* (2019) avaliou o efeito farmacológico do SEE e seus componentes bioativos silibinina e silicristina quando administrados isoladamente em células de câncer de próstata humano (PC-3). O extrato inibiu a proliferação de células PC-3 de uma maneira dose dependente. Em conclusão, o tratamento com SEE provocou perturbações no mecanismo autofágico das células cancerosas da próstata (PC-3) causando uma morte celular excessiva. Esses achados propõem o uso de SEE como agente citotóxico adjuvante. Sendo uma planta da mesma família da *A. oleracea*, os compostos bioativos sugerem uma semelhança no potencial existente do extrato EEFAo atuando sobre a próstata.

Falando-se em extratos vegetais utilizados seja na prevenção e/ou tratamento da HBP, a *Serenoa repens* conhecida como Saw palmeto, é a espécie mais estudada seja em ensaios experimentais ou clínicos, em diferentes países consta diversas monografias estabelecidas quanto ao seu uso terapêutico.

No estudo de Kwon (2019), o extrato de Saw Palmetto foi avaliado quanto à sua eficácia na melhoria de HBP e LUTS em níveis pré-clínicos e clínicos. Os potenciais mecanismos de ação incluíam efeitos anti-androgênicos, pró-apoptóticos e anti-inflamatórios. O fitosterol (β-sitosterol), presente no extrato hexânico inibiu a 5α-redutase, reduzindo assim a inflamação prostática.

A duas décadas atrás, essa planta era estudada com um agente promissor na inibição do mecanismo de HBP, Bayne (1999) usou uma concentração de 10 μg / ml que se mostrou ser um inibidor eficaz de ambas as isoenzimas 5α-redutase tipos I e II, sem influenciar a secreção de PSA pelas células epiteliais, mesmo após estimulação com testosterona. Ao contrário de outros inibidores da 5α-redutase, o Permixon ®, como foi chamado esse extrato de *S. repens,* induziu o efeito sem interferir na capacidade das células de secretar PSA, permitindo a contínua medição de PSA para rastreamento do câncer de próstata.

Outros estudos avaliaram seus aspectos morfológicos, em que o tratamento com o extrato de *S. repens*, diminuiu o padrão histológico e a hiperplasia induzida pela administração de testosterona (PATERNITI *et al.*, 2018).

Alcaraz *et al*. (2020) avaliaram o extrato hexânico de *S. repens* combinado à tansulosina em homens com sintomas moderados a graves do trato urinário inferior associados à HBP. Após 6 meses, as pontuações o IPSS melhorou em média de 7,2 (5,0) pontos, corroborando com outras pesquisas de que essa planta pode produzir alívio dos sintomas de forma eficaz com significativa melhora da qualidade de vida.

Uma pesquisa estudou a combinação do extrato de *S. repens* e *Pygeum Africanun*. Essas duas plantas possuem marcadores anti-inflamatórios, anti-androgênicos e efeitos anti-proliferativos. Esse estudo mostrou um potente efeito sinérgico dessa combinação sugerindo que esta pode oferecer melhorias significativas do estado urinário, sendo considerada uma terapia viável para o tratamento dos sintomas de LUTS em geral (STAMATIOU *et al.*, 2019).

No estudo de Saponaro *et al*. (2020) foi avaliada uma formulação combinada de *S. repens* com a *Urtica dioica* em um modelo humano *in vitro* de HBP. Os resultados confirmaram efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios e também redução simultânea da produção de espécies reativas de oxigênio, desempenhando um papel importante na inibição das vias pró-inflamatórias envolvidas no desenvolvimento e progressão da HBP. Em conjunto, esses resultados sugerem um papel promissor dessa combinação na prevenção de doenças relacionadas à HBP. Esses dois estudos e os nossos resultados que foram eficazes na redução de aspectos morfológicos da próstata ventral de roedores nos levaram ao questionamento se uma possível combinação de extrato de *A. oleracea* e *S. repens* poderia ser uma terapia eficaz no tratamento de HBP devido a possível sinergia dos compostos presentes nestas duas plantas.

De natureza igual, composições químicas que possuem ácidos graxos essenciais, ácido oleico e linoléico e fitoesteróis como é o caso do óleo da semente de abóbora (RABRENOVIC *et al.*, 2014; MARCONI, 2016; MEN *et al.*, 2021), também atuam como tratamento para HBP. Ramak e Mahboubi (2019) avaliaram a eficácia desse óleo, devido aos seus efeitos inibitórios sobre a 5α-redutase, efeitos anti-inflamatórios e a capacidade de eliminar os radicais livres como tratamento alternativo para HBP e bexiga hiperativa. O estudo mostrou que uma dose moderada de óleo graxo da semente de abóbora não foi tóxica para animais e seres humanos, e também teve efeitos protetores contra a genotoxicidade induzida.

Al-trade *et al.* (2020) ao avaliarem o efeito do óleo essencial e extrato etanólico da *Artemisia judaica* observaram no exame histológico uma morfologia melhorada nos ratos com

HBP tratados quando comparados ao controle. Esse estudo nos dá indício que plantas desse gênero possuem atividade sobre a próstata de animais com HBP, sustentando nossos resultados.

Quanto às alterações morfológicas características de HBP presentes na próstata ventral dos animais SHR, observamos um aumento de secreção nas células. Sabe-se que cerca de 70 % do volume prostático numa próstata com dimensões normais é formado por componentes glandulares e o desenvolvimento da HBP naturalmente faz com que essa porcentagem diminua levando a uma diminuição da secreção (SHAPIRO *et al.,* 1992).

Nesse caso, a administração do EEFAo no grupo SHR tratado se mostrou eficiente levando ao aumento de secreção quando diminuiu características hiperplásicas, consequentemente influenciando na funcionalidade das células prostáticas, uma vez que, a regulação dos fluidos secretados no epitélio prostático está diretamente relacionada aos processos biológicos da fertilidade masculina (VERZE; CAI; LORENZETTI, 2016; MOTRICH *et al.,* 2018).

Dentre os mecanismos propostos para a atividade da secreção celular, cita-se o AR, que atua tanto como receptor local intracelular e como transcrição ativada por fatores ligantes. Importante para manutenção da estabilidade epitelial, da homeostase e minimização da progressão maligna em casos de câncer de próstata. (LAMONT; TINDALL, 2010; TAKAYAMA; INOUE, 2013).

Visto que, com o envelhecimento, os níveis circulantes de testosterona e níveis intraprostáticos de DHT diminuem progressivamente prejudicando o funcionamento adequado da glândula, reduzindo sua capacidade de manter os níveis de tecido saudável e a secreção dos fluidos prostáticos (VERZE; CAI; LORENZETTI, 2016). Supõe-se que os compostos presentes no EEFAo agiram sobre a enzima 5α-redutase funcionando como co-estimulador positivo ou negativo de sua atividade.

Nossos resultados corroboram com diversas abordagens fitoterápicas amplamente propostas. A revisão de Santos, Howell; Teixeira (2019) analisou os efeitos de fitoterápicos nos parâmetros de testosterona, espermatozoides e próstata. O estudo evidenciou que o uso de Jack longo (*Eurycoma longifolia Jack, Simaroubaceae*), mucuna (*Mucuna pruriens* (L.) DC., Fabaceae), ashwagandha (*Withania somnifera* (L.) Dunal, Solanaceae), feno-grego (*Trigonella foenum-graceum* L., Fabaceae) e sementes pretas (*Nigella sativa* L., Ranunculaceae) podem ser eficientes no aumento da testosterona total e melhora dos parâmetros seminais. Também apoia o uso de Saw Palmetto para melhora da saúde da próstata, assim como apoiam o uso de *Pygeum africanum*, *Urtica dioica* L., Urticaceae, beta-sitosteróis, extrato de pólen, cebola, alho

e tomate, como tratamentos favoráveis e promissores (SANTOS; HOWELL; TEIXEIRA, 2019).

A avaliação do EEFAo na próstata de SHRs se revelou promissora quanto à quantificação da área de secreção, uma vez que esse resultado sugere potencial atividade afrodisíaca e também influências hormonais. Esse dado nos apresenta uma suposta atividade do extrato sobre o AR como aponta a seguinte análise.

5.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA RECEPTORES DE ANDRÓGENOS (AR)

Na reação de imuno-marcação para AR, observa-se marcações positivas em todos os grupos, com redução pontual significativa no grupo W EEFAo (Figura 16 e; f).

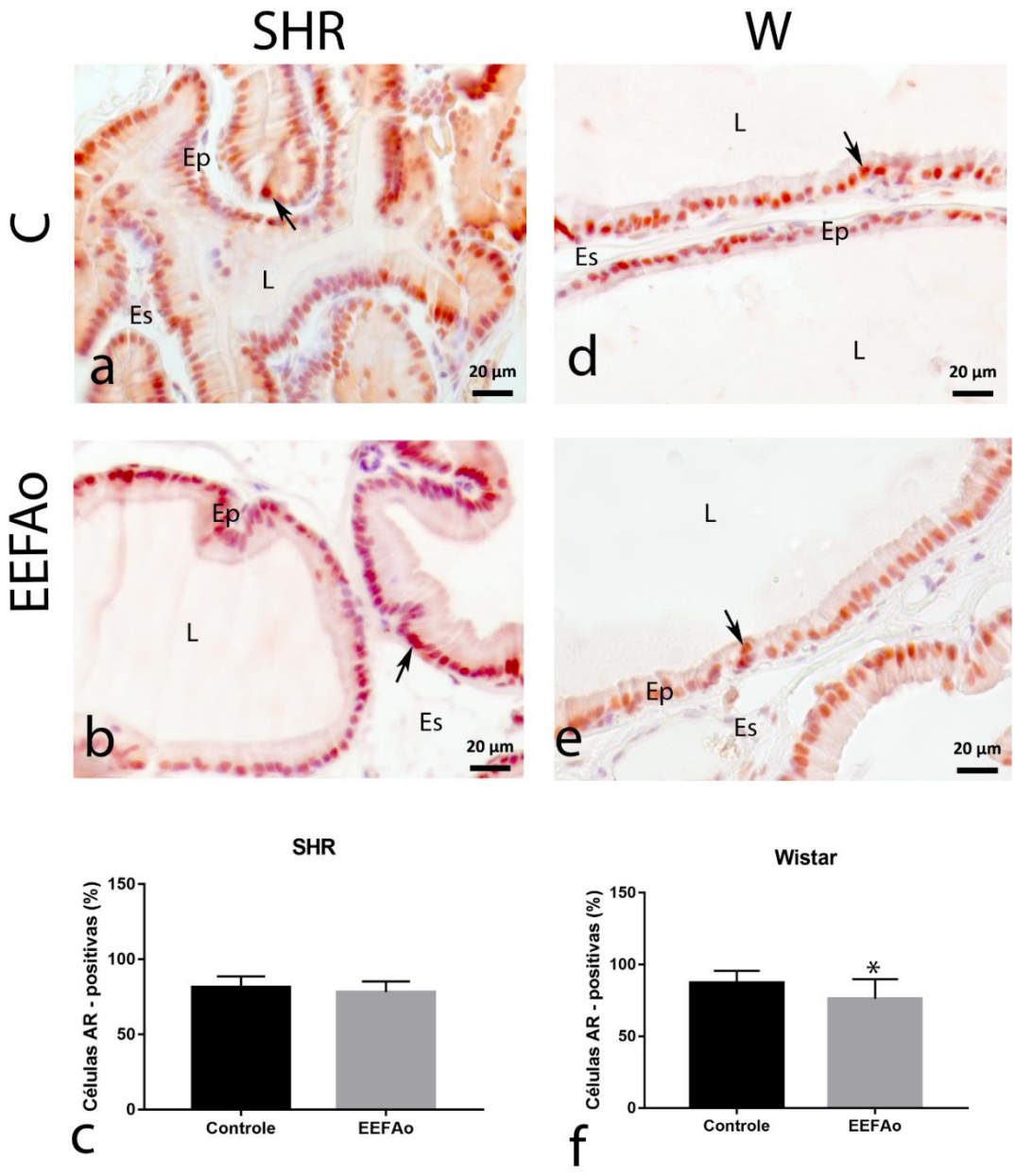

Figura 16. Imuno-histoquímica para AR. Reação imuno-histoquímica para receptores de andrógeno (AR) na próstata ventral de SHR e W. C = controle; EEFAo = Extrato etanólico das flores de *A. oleracea*. As fotomicrografias (a-b, d-e; 400x magnificação) evidenciam a presença de marcações AR-positivas (setas) em todos os grupos experimentais. A quantificação de células AR-positivas (c, f) indica que não ocorreram alteração da frequência deste marcado nos animais SHR, mas que ocorreu redução significativa deste marcador no grupo W EEFAo. Os valores correspondem à média ± desvio padrão. *Análise estatística baseada no teste-t ($p \leq 0,05$); (*) representa a diferença estatística entre os grupos. Fonte: Autor.

Como exposto no tópico anterior, os receptores androgênicos são de extrema importância para regulação e manutenção da próstata, assim como também estão associados significativamente com a ocorrência e progressão da HBP. A diminuição de AR na PV do grupo W EEFAo, confirma sua relação direta com a diminuição da atividade secretora (Figura 15). Com base nos resultados, pode-se sugerir uma ação bloqueadora de andrógenos do EEFAo, necessitando de estudos que investiguem essa ação no tratamento de disfunções prostáticas em ratos Wistar.

Na literatura já existem estudos de extratos que inibiram proliferação celular relacionadas à próstata. Liu *et al.* (2019) avaliaram o extrato a base de plantas da casca da árvore Pao Pereira da floresta amazônica e o tratamento reduziu o índice proliferativo nas glândulas da próstata e os níveis de expressão de AR induzida por testosterona, bem como proteínas associadas a andrógenos, como SRD5A1 e PSA. Além disso, o extrato de Pao e seu componente ativo, flavopereirina, suprimiram os níveis de expressão de SRD5A1, AR e PSA, respectivamente, apontando que o extrato interrompe o desenvolvimento de HBP induzido por testosterona por meio da inibição da atividade e expressão de AR, sugerindo ser um agente promissor para esse tratamento (LIU *et al.*, 2019).

A flavopereirina, é um composto alcaloide ativo no extrato de Pao Pereira. As investigações fitoquímicas dos extratos de *A. oleracea* também mostram a presença de alcalóides em seus compostos bioativos (RONDANELLI *et al.*, 2020) podendo haver sinergia entre esses compostos agindo na atividade redutora nos níveis de expressão AR. Logo, foi levantada a seguinte pergunta se o mesmo teria influência sobre a proliferação celular via PCNA. Visto que, o PCNA é um marcador de proliferação celular, que desempenha um papel essencial na divisão celular, replicação de DNA, remodelação de cromatina e vários outros processos celulares (CHEON *et al.*, 2020).

5.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA PCNA

Na reação de imuno-marcação de PCNA na PV, foi observado marcação positiva em todos os grupos experimentais, com diferença significativa no grupo SHR T (b) apresentando diminuição na taxa de proliferação celular (Figura 17).

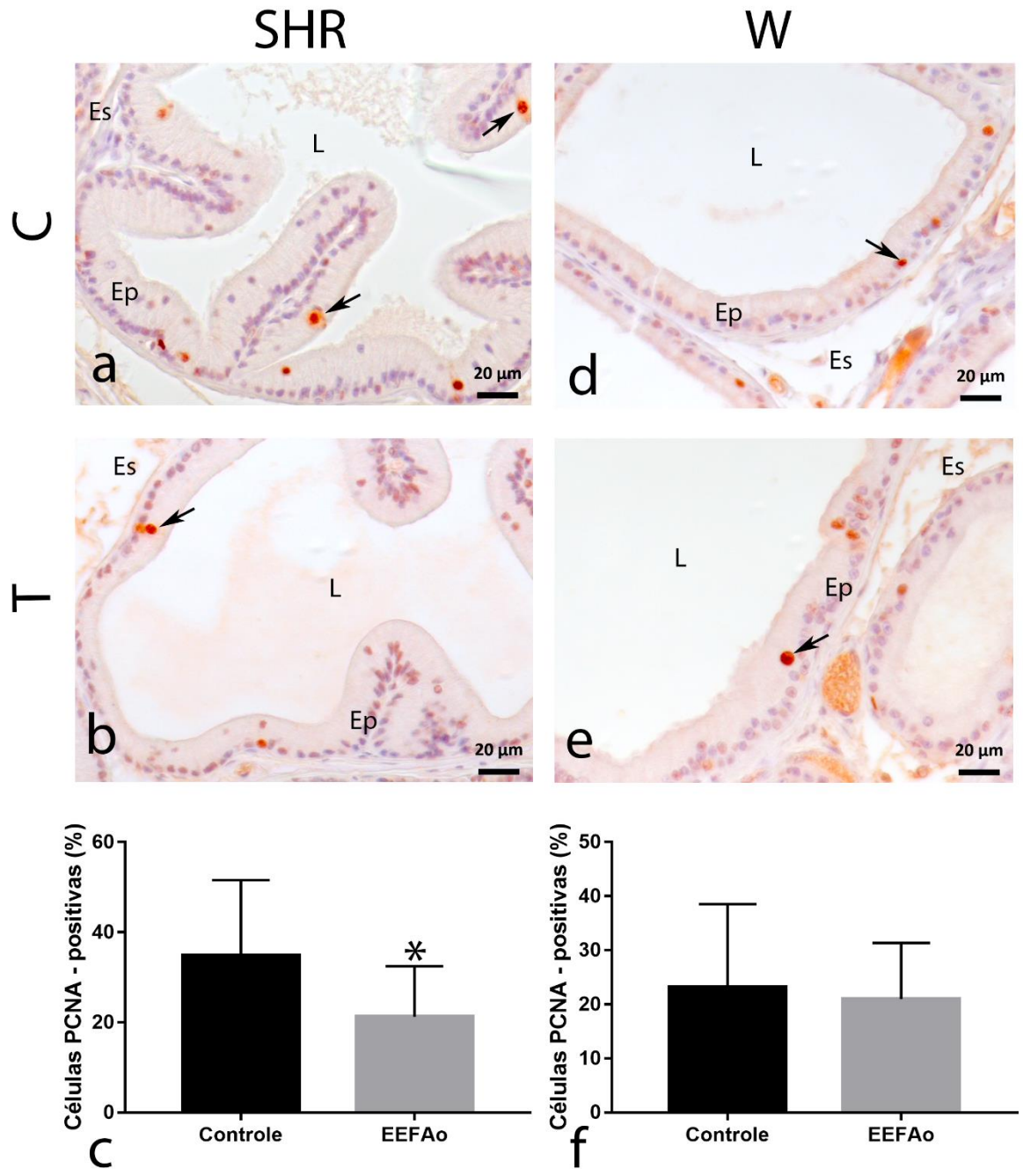

Figura 17. Reação de Imuno-histoquímica para PCNA e Frequência relativa (%) das células PCNA positiva na próstata de SHR e W. Análise imuno-histoquímica para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) para SHR (a-b) e W (d-e). As siglas indicam, Epitélio (Ep), estroma (Es), lúmen (L), as setas indicam as células positivas para PCNA no epitélio prostático. C = controle; EEFAo = Extrato etanólico das flores de *A. oleracea*. Fotomicrografias em aumento de 400x, contracoloração pela hematoxilina. (c-f) Os valores correspondem à média ± desvio padrão *Análise estatística baseada no teste-t ($p \leq 0,05$); (*) representa a diferença estatística entre os grupos. Fonte: Autor.

Apesar da carência de estudos da atividade antiproliferativa dos extratos de *A. oleracea*, nossos resultados corroboram com o estudo recente de Weintraub (2020). O autor investigou a atividade antiproliferativa do gênero Acmella - *Acmella alba, Acmella oleracea, e Acmella calirrhiza.* Foram separados folhas, raízes, caules e flores, liofilizados e moídos em um pó fino

e células de adenocarcinoma de ovário humano (SKOV - 3) foram tratadas com 0,2 mg / mL de cada extrato, paclitaxel 100 μM ou dimetilsulfóxido (DMSO; veículo). Tanto o paclitaxel reduziu significativamente a viabilidade celular, como as folhas, raízes e caules de *Acmella alba*, as folhas e raízes de *Acmella oleracea* e as folhas, caules e flores de *Acmella calirrhiza* também resultaram em uma diminuição significativa da viabilidade celular de células SKOV - 3 em comparação com DMSO.

Embora este seja um dos poucos estudos existentes com o gênero Acmella, a *Artemisia judaica* L. que pertence à mesma família da *A. oleracea*, como já citado, é popular no uso medicinal no combate a algumas doenças, como distúrbios do sistema digestivo, diabetes, inflamação e câncer (NAWASH *et al.,* 2013; ABU-DARWISH *et al.,* 2016). O seu óleo essencial e o extrato etanólico exibem potentes propriedades antiangiogênicas, anti-inflamatórias (ZIHLIF *et al.,* 2012; ABU-DARWISH *et al.,* 2016) e também atividade antioxidantes (LIU *et al.,* 2004).

Em 2011, pela primeira vez foi estudado o potencial dos extratos de sete espécies de Artemisia e estas mostraram atividade antiproliferativa em diferentes linhas de células de câncer humano (TAGHIZADEH RABE *et al.,* 2011). Recentemente, outro estudo avaliou o efeito do óleo essencial e o extrato etanólico da *Artemisia Judaica*, sobre a hiperplasia benigna induzida na próstata de ratos wistar, e os resultados mostraram que o óleo essencial e o extrato etanólico inibiram potentemente a proliferação de células epiteliais da próstata, indicado pela diminuição da expressão de mRNA de PCNA, mostrando então atividade antiproliferativa, anti-inflamatória e angiogênica (AL-TRAD *et al.,* 2020).

Nossos resultados corroboram com essas pesquisas, já que EEFAo também apresentou efeito antiproliferativo sobre a HBP espontânea de SHR.

5.8 TESTES BIOQUÍMICOS

Nos testes bioquímicos de marcadores biológicos para estresse oxidativo e atividade enzimática para o grupo SHR, os resultados apresentaram reduções significativas no grupo SHR EEFAo. Observa-se uma redução nos níveis de MDA nas quantificações de LPO (A). Também houve redução na atividade da superóxido dismutase (B) e atividade da catalase (C), demonstrando que o EEFAo atuou na atividade enzimática da próstata desses roedores (Figura 18).

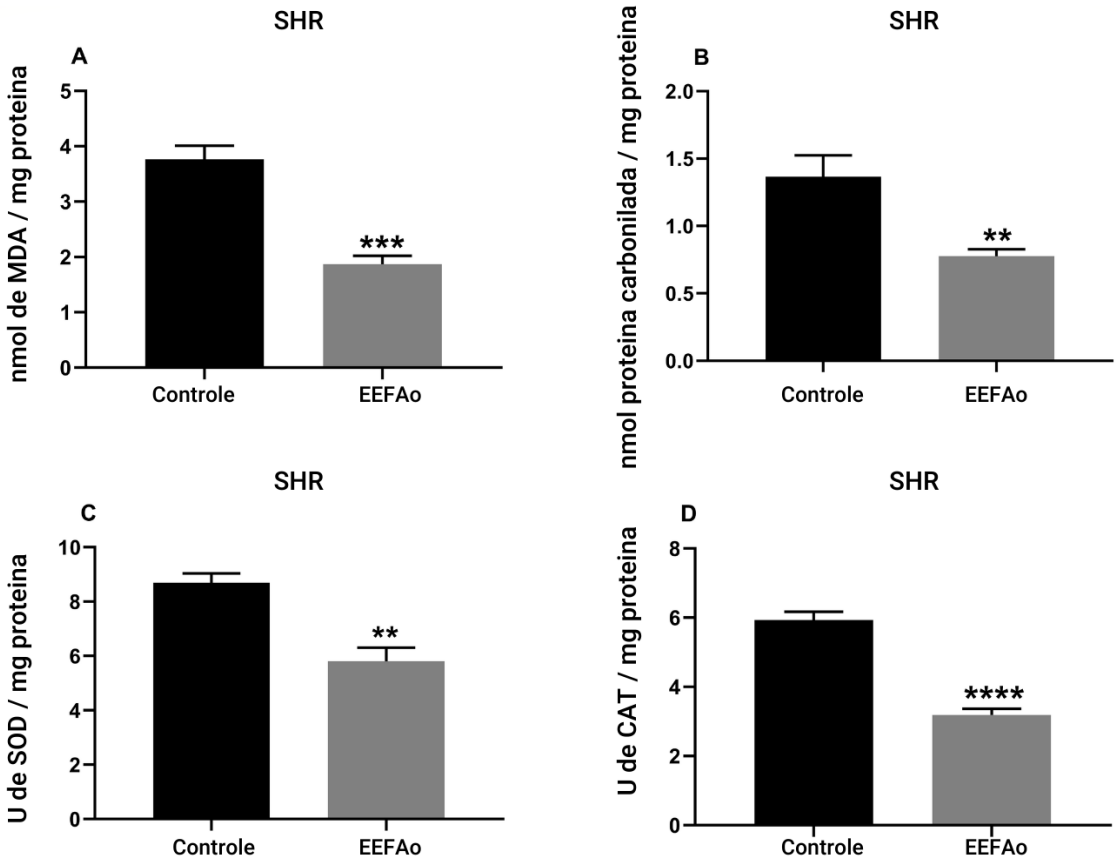

Figura 18. Marcador de estresse oxidativo e Atividade Enzimática na próstata de ratos macho SHR: Avaliação dos níveis de LPO da próstata (A), níveis de CP (B), atividade SOD (C) e atividade CAT (D). Os dados representam a média ± S.E.M. para n = 5 a 9 animais por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste t. * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001, **** p <0,0001 quando comparado ao grupo SHR C. Fonte: Autor.

Na figura 19, foram avaliados os mesmos testes para marcadores biológicos e atividade enzimáticas de SOD (A) e CAT (B) da próstata ventral do grupo W. Observamos redução de MDA na quantificação de LPO (A), redução de proteínas carboniladas (B), SOD (C) e CAT (D) em todos os testes.

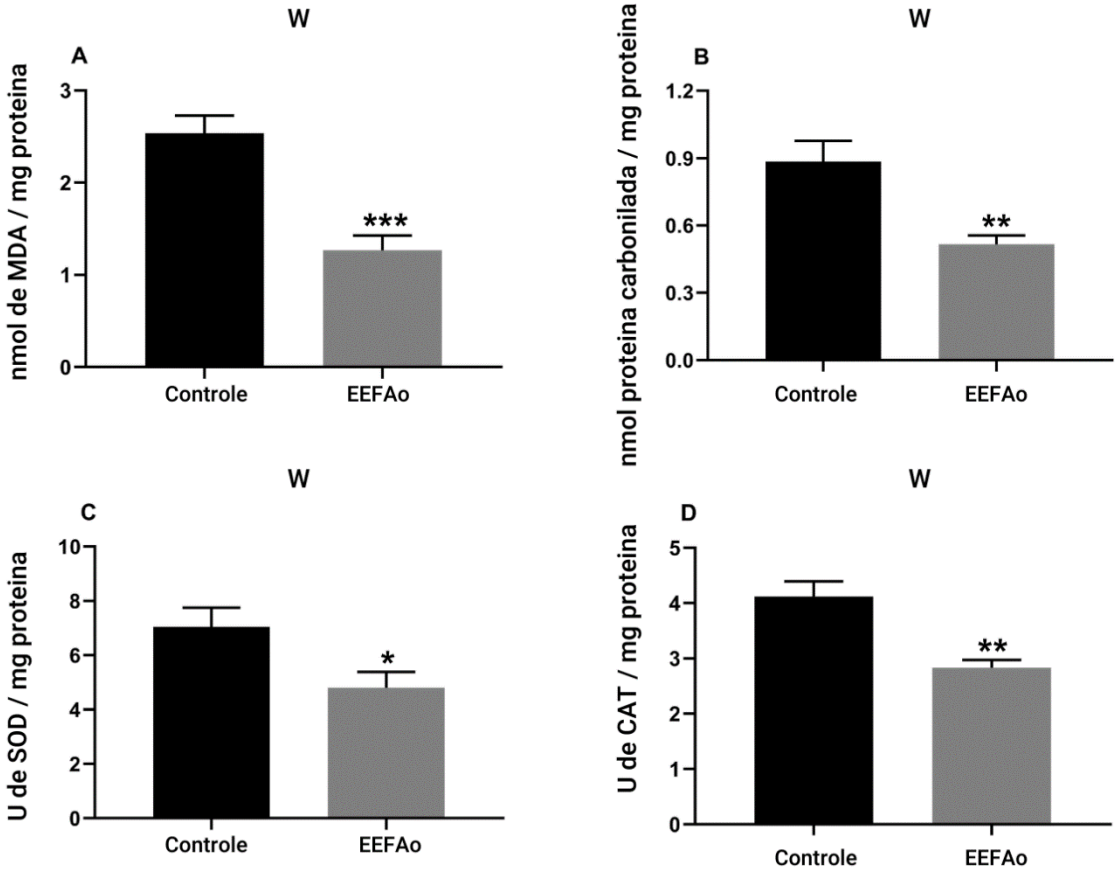

Figura 19. Marcador de estresse oxidativo e Atividade Enzimática na próstata de ratos macho W: Avaliação dos níveis de LPO da próstata (A), níveis de proteína carbonilada (B), atividade SOD (C) e atividade CAT (D). Os dados representam a média ± S.E.M. para n = 5 a 9 animais por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste t. * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001, **** p <0,0001 quando comparado ao grupo WC. Fonte: Autor.

Decerto o estresse oxidativo estaria presente em níveis consideráveis no grupo SHR, todavia, supomos que a atividade antioxidante do EEFAo tenha reduzido a dimensão dessa atividade no grupo SHR EEFAo. Todavia, podemos observar reduções também no grupo W EEFAo. Esses dois resultados foram eficazes ao mostrar a redução de radicais livres e espécies reativas na próstata desses roedores. Essa condição pode ser atribuída ao grande potencial anti-inflamatório e antioxidante do extrato etanólico das flores *A. oleracea*.

Na revisão sistemática da Cochrane, Showell *et al*. (2014) propuseram mais ensaios planejados, randomizados e controlados por placebo para esclarecer a efetividade e garantia da suplementação oral com antioxidantes para homens inférteis que procuram assistência para fertilidade.

Vários estudos já avaliarem a atividade antioxidante da *A. oleracea,* porém não encontramos pesquisas que estudem seu efeito sobre a próstata, nos levando a inexistência de

resultados semelhantes, porém esses estudos confirmam nosso resultado quanto ao poder antioxidante e anti-inflamatório do extrato.

No estudo de Dallazen *et al.* (2020), foi avaliado o efeito de uma injeção intraplantar em camundongos, de uma fração de hexano rica em alquilamida (HF) obtida de flores de jambu e da isobultilalquilamida sintética (IBA), onde apresentaram efeitos antinociceptivos e anestésicos em modelos de dor aguda. No pico da inflamação, HF e IBA (0,1 µg) reduziram a atividade da mieloperoxidase, os níveis de TNF-α e IL-1β, impediram a produção de hidroperóxidos lipídicos e a diminuição de agentes antioxidantes (SOD, CAT e conteúdo de glutationa).

Stein *et al.* (2021) caracterizaram os efeitos anti-inflamatórios dos extratos de folhas e flores de *A. oleracea*, incluindo espilantol isolado sobre a geração de óxido nítrico (NO), inibição e expressão de quimase e atividade de radical de CAT e SOD. A expressão da atividade de quimase, NO, CAT e SOD foram atenuados pela presença dos extratos e espilantol que inibiu significativamente a produção de NO e infiltração do tecido celular.

No estudo de Gonçalves *et al.* (2021), foi investigado o efeito do extrato de *Acmella ciliata* (que apresenta as mesmas características organolépticas de *A. oleracea*) no comprometimento da memória e estresse oxidativo no cérebro após administração intracerebral de 0,5 mg/kg de estreptozotocina em camundongos. Foi avaliado a atividade da CAT, SOD, glutationa reduzida, glutationaperoxidase, glutationa redutase e enzimas glutationa-S-transferase e concentração de MDA. O extrato diminuiu a oxidação, pois evidenciou uma diminuição significativa de MDA e um aumento nos níveis de marcadores antioxidantes.

O estudo de Lallthanpuii e Lalchhandama (2009) realizado com extrato metanólico de *Spilanthes acmella* (L.) Murray (*A. oleracea*) avaliou suas propriedades como agente protetor de danos ao DNA e proliferação celular. Realizando ensaios de DPPH, NO, ferricianeto de potássio, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio. O extrato da planta mostrou atividade eliminadora de radicais livres em todos os testes mostrando ser uma fonte promissora na prevenção do desenvolvimento de câncer e danos ao DNA. Esses estudos confirmam o potencial antioxidante presente no extrato de *A. oleracea*, mesmo que administrado em doses diferentes e em avaliações diferentes da realizada em nosso estudo. Nossos resultados preliminares da ação do EEFAo no estudo da próstata validam a ação antioxidante do extrato e se mostra benéfico ao tratamento da próstata.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, nossos resultados histopatológicos demonstraram que o tratamento com 100 mg/kg de extrato etanólico das flores de *A. oleracea* atenuou características hiperplásicas na próstata de SHRs. A imuno-histoquímica apresentou redução de marcadores de AR na próstata de Wistar, e redução de marcadores de PCNA na próstata de SHRs. A morfometria e estereologia apresentou redução de fibras colágenas na próstata de SHRs. A quantificação de secreção prostática mostrou aumento da atividade secretora em SHRs e diminuição dessa atividade em Wistar. As análises bioquímicas mostraram que o EFFAo agiu como agente anti-oxidante, apresentando redução de MDA na quantificação de LPO, redução de proteínas carboniladas, e redução da atividade de SOD e CAT. Adicionalmente, o extrato não causou citotoxidade nos animais SHR e Wistar e também não causou efeitos adversos relevantes na próstata ventral de ratos Wistar. Esses dados indicam que esse extrato pode ser um medicamento fitoterápico promissor em estudos na redução de sintomas da HPB. É fundamental a continuidade de pesquisas dessas atividades presentes no extrato sobre a próstata, com ensaio clínico e segurança em humanos.

REFERÊNCIAS

AARON, L; FRANCO, O. E; HAYWARD, S. W. Review of prostate anatomy and embryology and the etiology of benign prostatic hyperplasia. **Urologic Clinics**, v. 43, n. 3, p. 279-288, 2016.

ABEYSIRI, G. R. P. I. *et al*. Screening of phytochemical, physico-chemical and bioactivity of different parts of *Acmella oleraceae* Murr. (Asteraceae), a natural remedy for toothache. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 852-856, 2013.

ABU-DARWISH, M. S. *et al*. Chemical composition and biological activities of Artemisia judaica essential oil from southern desert of Jordan. **Journal of ethnopharmacology**, v. 191, p. 161-168, 2016.

ABU-REIDAH, I. M. *et al*. Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (Cynara scolymus L.) by HPLC–DAD-ESI-QTOF-MS. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2269-2277, 2013.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AJAYI, A; ABRAHAM, K. Understanding the role of estrogen in the development of benign prostatic hyperplasia**. African Journal of Urology**, v. 24, n. 2, p. 93-97, 2018.

ALCARAZ, A. *et al*. Clinical Benefit of tamsulosin and the hexanic extract of *Serenoa Repens*, in combination or as monotherapy, in patients with moderate/severe LUTS-BPH: A subset analysis of the QUALIPROST Study. **Journal of Clinical Medicine,** 2020. Disponível em: < https://www.mdpi.com/2077-0383/9/9/2909>. Acesso em 21 dez. 2021.

ALLKANJARI, O; VITALONE, A. O que sabemos sobre fitoterapia da hiperplasia benigna da próstata?. Ciências da vida, v. 126, p. 42-56, 2015.

ALONSO, I. G. *et al.* A new approach for the total synthesis of spilanthol and analogue with improved anesthetic activity. **Tetrahedron**, v. 74, n. 38, p. 5192-5199, 2018.

ALSHAHRANI, S; MCGILL, J; AGARWAL, A. Prostatitis and male infertility. **Journal of reproductive immunology**, v. 100, n. 1, p. 30-36, 2013.

AL-TRAD, B. *et al*. Effects of *Artemisia judaica* essential oil and ethanolic extract on experimentally-induced benign prostatic hyperplasia. **Pharmacognosy Magazine**, v. 16, n. 5, p. 561-565, 2020.

ALVES, D. F. F. **Os extratos de plantas medicinais na prevenção e no tratamento da hiperplasia benigna da próstata**. 2020. 121 f. Dissertação de mestrado (Ciências Farmacêuticas) - Universidade Beira Interior, [*S. l.*], 2020. Disponível em: <https://ubibliorum.ubi.pt/bitstream/10400.6/10638/1/7889_16612.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2021.

ANDERSSON, K. *et al*. Tadalafil for the treatment of lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia: pathophysiology and mechanism (s) of action. **Neurourology and urodynamics**, v. 30, n. 3, p. 292-301, 2011.

ANHOLETO, L. A. *et al.* Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)(Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 8, n. 1, p. 65-72, 2017.

APOLLONI, L. B. *et al*. The Role of Androgens in Mammals Folliculogenesis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 1, p. 15, 2016.

ARILTON, J. B. J. *et al.* Câncer De Próstata: Métodos De Diagnóstico, Prevenção E Tratamento. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research -BJSCR**, v. 10, n. 3, p. 40–46, 2015.

AUFFENBERG, G. B; HELFAND, B. T; MCVARY, K. T. Established Medical Therapy for Benign Prostatic Hyperplasia. **Urologic Clinics of North America**, v. 36, n. 4, p. 443–459, 2009.

AWAD, A. B; FINK, C.S. Fitoesteróis como componentes da dieta anticâncer: evidências e mecanismo de ação. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 9, p. 2127-2130, 2000.

BAE, S. S. *et al.* A validated chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 438-443, 2010

BANERJEE, P. P. *et al*. Androgen action in prostate function and disease. **American journal of clinical and experimental urology**, v. 6, n. 2, p. 62, 2018.

BARTSCH, G. *et al*. Dihydrotestosterone and the concept of 5-reductase inhibition in human benign prostatic hyperplasia. World Journal of Urology, [s.l.], v. 19, n. 6, p.413-425, 2002.

BAYNE, C. W. *et al*. *Serenoa repens* (Permixon®): A 5α-reductase types I and II inhibitor—new evidence in a coculture model of BPH. **The Prostate**, v. 40, n. 4, p. 232-241, 1999.

BERRY, S. J. *et al.* The development of human benign prostatic hyperplasia with age. **The Journal of urology**, v. 132, n. 3, p. 474-479, 1984.

BOONEN, J. *et al*. Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthes acmella* (Compositae) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 77-84, 2010.

BOSLAND, M. C. Chemical and hormonal induction of prostate cancer in animal models. In: **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. Elsevier, v. 2, n. 4, p. 103-110, 1996.

BOYLE, P; NAPALKOV, P. The epidemiology of benign prostatic hyperplasia and observations on concomitant hypertension. **Scandinavian journal of urology and nephrology**. Supplementum, v. 168, p. 7-12, 1995.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRENDLER, C. B. *et al*. Spontaneous benign prostatic hyperplasia in the beagle. Age-associated changes in serum hormone levels, and the morphology and secretory function of the canine prostate. **The Journal of clinical investigation**, v. 71, n. 5, p. 1114-1123, 1983.

BRESSAN, W. S. C. **Hiperplasia prostática benigna: uma revisão atual e novas abordagens**. 2015. 80 f. TCC (Especialização de Farmacologia) - Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, [*S. l.*], 2015. Disponível em: <http://repositorio.unesc.net/bitstream/1/3601/1/Wagner%20Sperling%20C%c3%a2ndido%20Bressan.pdf>. Acesso em: 12 out. 2021.

CAINE, M. The present role of alpha-adrenergic blockers in the treatment of benign prostatic hypertrophy. **The Journal of urology**, v. 136, n. 1 Part 1, p. 1-4, 1986.

CAINE, M; PERLBERG, S; GORDON, R. The treatment of benign prostatic hypertrophy with flutamide (SCH 13521): a placebo-controlled study. **The Journal of urology**, v. 114, n. 4, p. 564-568, 1975.

CALOGERO, A. E. *et al*. Epidemiology and risk factors of lower urinary tract symptoms/benign prostatic hyperplasia and erectile dysfunction. **The Aging Male**, v. 22, n. 1, p. 12-19, 2019.

CAPECE, M. *et al*. Does physical activity regulate prostate carcinogenesis and prostate cancer outcomes? A narrative review. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 4, p. 1441, 2020.

CARDOSO, M. O. (org.). **Hortaliças Não-convencionais da Amazônia**. 1997. ed. Brasília: Embrapa, 1997. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/214084/1/Hortalicas-nao-convencionais-da-Amazonia-Feijao-de-metro.pdf> Acesso em: 26 nov. 2021

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

CAVALCANTE, R. **Fitodontologia**. Rio Branco - Acre: Câmara Brasileira do livro, 2013. 241 p. v. 1. ISBN 978-85-914146-3-5. Disponível em: <https://www.google.com.br/books/edition/Fitodontologia/JMxLBQAAQBAJ?hl=pt-BR&gbpv=1>. Acesso em: 16 nov. 2021.

CEKANOVA, M; RATHORE, K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. **Drug design, development and therapy**, v. 8, p. 1911, 2014.

CHAKRABORTY, A. *et al*. Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animal models. Indian Journal of Pharmacology, v. 42, p. 277-279, 2010.

CHAKRABORTY, A. R. K. B. *et al*. Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. **Indian journal of pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 148, 2004.

CHEON, S. *et al.* Oleanolic acid ameliorates benign prostatic hyperplasia by regulating pcna-dependent cell cycle progression in vivo and in vitro. **Journal of natural products**, v. 83, n. 4, p. 1183-1189, 2020.

CHUNG, M. S; YOON, B. I; LEE, S. H. Eficácia Clínica e Segurança do Tratamento com Naftopidil para Pacientes com Hiperplasia Prostática Benigna e Hipertensão: Um Estudo Prospectivo Aberto. Jornal medico Yonsei, v. 58, n. 4, p. 800-806, 2017.

CLARK, R. V. *et al.* Marked suppression of dihydrotestosterone in men with benign prostatic hyperplasia by dutasteride, a dual 5α-reductase inhibitor. **The journal of clinical endocrinology & metabolism**, v. 89, n. 5, p. 2179-2184, 2004.

COLOMBO, G. *et al.* A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 1019, p. 178-190, 2016.

COOKE, P. S. *et al.* Estrogênios na fisiologia masculina. **Revisões fisiológicas**, v. 97, n. 3, p. 995-1043, 2017.

COSTA TRINDADE, P. S. *et al*. Avaliação da Produção de Fitomassa e Sintomas de Deficiência na Cultura do Jambu [*Acmella oleracea* (l.) RK Jansen] Cultivado Sob Omissão de Macronutrientes e Ferro. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 3, p. 1555-1571, 2020.

COSTA, E. E. L. M. *et al.* A importância da atividade física no tratamento do diabetes tipo I. **Caderno Intersaberes**, v. 9, n. 17, 2020.

DALLAZEN, J. L. *et al*. Pharmacological potential of alkylamides from *Acmella oleracea* flowers and synthetic isobutylalkyl amide to treat inflammatory pain. **Inflammopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 175-186, 2020

DAVIDIAN, M. H. Guidelines for the treatment of benign prostatic hyperplasia. **US Pharm**, v. 41, n. 8, p. 36-40, 2016.

DHINGRA, N; BHAGWAT, D. Benign prostatic hyperplasia: An overview of existing treatment. **Indian journal of pharmacology**, v. 43, n. 1, p. 6, 2011.

DI SILVERIO, F. *et al.* Efeitos do tratamento a longo prazo com *Serenoa repens* (Permixon®) nas concentrações e distribuição regional de andrógenos e fator de crescimento epidérmico na hiperplasia prostática benigna. A Próstata, v. 37, n. 2, p. 77-83, 1998.

DIAS, A. M. A. *et al.* Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 62–70, 2012.

DOS SANTOS, C. P. *et al.* A importância da utilização da espécie *Acmella oleracea* L. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 481-485, 2019.

DREIKORN, K. The role of phytotherapy in treating lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia. **World journal of urology**, v. 19, n. 6, p. 426-435, 2002.

DUBEY, S. *et al*. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: a review. **Advances in Pharmacological Sciences,** v.3, 2013.

DUTT, S. S; GAO, A. C. Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression. **Future oncology**, v. 5, n. 9, p. 1403-1413, 2009.

ELLEM, S. J; RISBRIDGER, G. P. The Dual, Opposing Roles of Estrogen in the Prostate. Annals Of The New York Academy of Sciences, [s.l.], v. 1155, n. 1, p.174-186, 2009.

ESPOSITO, K. *et al.* Effect of lifestyle changes on erectile dysfunction in obese men: a randomized controlled trial. Jama, v. 291, n. 24, p. 2978-2984, 2004.

EVANS, Ronald M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, v. 240, n. 4854, p. 889-895, 1988.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FAVORETO, R; GILBERT, B. Estado da Arte/State of the Art - *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. **Revista Fitos**, v. 5, n. 1, p. 83–91, 2010.

FREITAS-BLANCO, V. S. *et al*. Isolation of spilanthol from *Acmella oleracea* based on Green Chemistry and evaluation of its in vitro anti-inflammatory activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 140, p. 372-379, 2018.

GANDAGLIA, G. *et al.* The role of chronic prostatic inflammation in the pathogenesis and progression of benign prostatic hyperplasia (BPH). **BJU international**, v. 112, n. 4, p. 432-441, 2013.

GIOTI, K. *et al*. Silymarin enriched extract (*Silybum marianum*) additive effect on doxorubicin-mediated cytotoxicity in PC-3 prostate cancer cells. **Planta medica**, v. 85, n. 11/12, p. 997-1007, 2019.

GOLOMB, E. *et al*. Spontaneous hyperplasia of the ventral lobe of the prostate in aging genetically hypertensive rats. **Journal of andrology**, v. 21, n. 1, p. 58-64, 2000.

GONÇALVES, A. E. *et al*. Protective Effect of *Acmella ciliata* Extract and Spilanthol in Streptozotocin-induced Sporadic Alzheimer's Disease Mouse Model: Possible Involvement of the of Decreased Oxidative Stress by Activating TRPV1 Receptors. 2021. Disponível em: < https://assets.researchsquare.com/files/rs-282279/v1/65f46e41-f755-42ca-9770-0cfe6d442ebc.pdf?c=1631878828> Acesso em: 21 out. 2021.

GRUMBACH, M. M; AUCHUS, R. J. Estrogen: consequences and implications of human mutations in synthesis and action. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 12, p. 4677-4694, 1999.

GUPTA, N; PATEL, A. R.; RAVINDRA, R. P. Design of Akkalkara (*Spilanthes acmella*) formulations for antimicrobial and topical anti-inflammatory activities. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 3, n. 4, p. 161-170, 2012.

HAGA, N. *et al.* The association between local atherosclerosis of the prostatic artery and benign prostatic enlargement in humans: Putative mechanism of chronic ischemia for prostatic enlargement. **The Prostate**, v. 78, n. 13, p. 1001-1012, 2018.

HASANUZZAMAN, M. *et al*. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. In: **Crop stress and its management: perspectives and strategies**. Springer, Dordrecht, p. 261-315. 2012.

HAYWARD, S. W. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. **Urologic Clinics of North America,** v. 43, n. 3, p. 279–288, 2016.

HOSSEINABADI, O. K. *et al*. Benign prostatic hyperplasia treatment using plasmonic nanoparticles irradiated by laser in a rat model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 127, p. 110118, 2020.

ISAACS, J. T. Prostate stem cells and benign prostatic hyperplasia. **The Prostate**, v. 68, n. 9, p. 1025-1034, 2008.

ISSA, M. M. *et al*. An assessment of the diagnosed prevalence of diseases in men 50 years of age or older. **American Journal of Managed Care**, v. 12, n. 4, p. S83, 2006.

ITO, H. *et al*. IPSS is lower in hypertensive patients treated with angiotensin-II receptor blocker: posthoc analyses of a lower urinary tract symptoms population. **Neurourology and urodynamics**, v. 32, n. 1, p. 70-74, 2013.

ITO, H.*et al.* Male lower urinary tract symptoms: hypertension as a risk factor for storage symptoms, but not voiding symptoms. LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms, v. 4, n. 2, p. 68-72, 2012.

JAVARONI, V; NEVES, M. F. Erectile dysfunction and hypertension: impact on cardiovascular risk and treatment. **International journal of hypertension**, v. 2012, 2012.

KAWABE, K. Silodosin Clinical Study Group. Silodosin, a new alpha1A-adrenoceptor-selective antagonist for treating benign prostatic hyperplasia: results of a phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study in Japanese men. BJU Int., v. 98, p. 1019-1024, 2006.

KWON, Y. Use of saw palmetto (*Serenoa repens*) extract for benign prostatic hyperplasia. **Food science and biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 1599-1606, 2019.

LALTHANPUII, P. B. *et al*. Antioxidant and cytotoxic properties of *Acmella oleracea*. **Medicinal Plants-International Journal of Phytomedicines and Related Industries**, v. 10, n. 4, p. 353-358, 2018.

LALTHANPUII, P. B; LALAWMPUII, R.; LALCHHANDAMA, K. Phytochemical analyses, antioxidant and antibacterial activities of *Acmella oleracea*, a variety grown in Mizoram. **Int. J. Pharmacogn**, v. 4, p. 100-104, 2017.

LAMONT, K. R; TINDALL, D. J. Androgen regulation of gene expression. **Advances in cancer research**, v. 107, p. 137-162, 2010.

LANGAN, R. C. Benign prostatic hyperplasia. Primary Care: Clinics in Office Practice, v. 46, n. 2, p. 223-232, 2019.

LAPORNIK, B; PROSEK, M., WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 214-222, 2005

LIAO, C; KUO, Y; KUO, H. Preditores de monoterapia antimuscarínica de primeira linha bem-sucedida em homens com aumento da próstata e sintomas predominantes de armazenamento. Urology, v. 81, n. 5, p. 1030-1033, 2013.

LIU, C. Z. *et al*. *Artemisia judaica* L.: micropropagation and antioxidant activity. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 1, p. 63-71, 2004.

LIU, J. *et al. Pao pereira* extract Attenuates testosterone-induced Benign prostatic Hyperplasia in Rats by inhibiting 5α-Reductase. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

LOWE, F.C. *et al.* Long-term 6-year experience with finasteride in patients with benign prostatic hyperplasia. Urology, v. 61, n. 4, p. 791-796, 2003.

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

LUCIA, M. S. *et al.* Workgroup I: rodent models of prostate cancer. **The Prostate**, v. 36, n. 1, p. 49-55, 1998.

MACEY, M. R; RAYNOR, M. C. Diagnosis of Benign Prostatic Hyperplasia. In: **Prostatic Artery Embolization**. Springer, Cham, p. 11-19. 2020.

MADERSBACHER, S; SAMPSON, N; CULIG, Z. Pathophysiology of benign prostatic hyperplasia and benign prostatic enlargement: a mini-review. Gerontology, v. 65, n. 5, p. 458-464, 2019.

MARCONI, L. F. C. B. **Caracterização de óleos comestíveis de alto valor agregado: propriedades físico-químicas, perfil cromatográfico e atividade antioxidante**. 2016. 44 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2016. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/6692/3/CM_COEAL_2016_2_10.pdf>. Acesso em: 26 out. 2021.

MATHUR R. P. *et al.* Role of Alpha Blockers in Hypertension with Benign Prostatic Hyperplasia. Supplement to Journal of the association of physicians of India. v. 62, 2014

MATITYAHOU, A; ROSENZWEIG, N; GOLOMB, E. Rapid proliferation of prostatic epithelial cells in spontaneously hypertensive rats: a model of spontaneous hypertension and prostate hyperplasia. **Journal of andrology**, v. 24, n. 2, p. 263-269, 2003.

MATTHIAS, A. *et al.* Alkylamides from Echinacea modulate induced immune responses in macrophages. **Immunological Investigations**, v. 36, n. 2, p. 117-130, 2007

MCNEAL, J. E. Regional morphology and pathology of the prostate. **American journal of clinical pathology**, v. 49, n. 3, p. 347–357, 1968.

MCNEAL, J. E. Normal and pathologic anatomy of prostate. 1981a.

MCNEAL, J. E. Normal histology of the prostate. **The American journal of surgical pathology**, v. 12, n. 8, p. 619-633, 1988.

MCNEAL, J. E. The zonal anatomy of the prostate. **The prostate**, v. 2, n. 1, p. 35-49, 1981b.

MCPHERSON, S. J; ELLEM, S. J.; RISBRIDGER, G. P. Estrogen-regulated development and differentiation of the prostate. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p. 660-670, 2008.

MENG, E. *et al.* Pathophysiology of overactive bladder. **LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms**, v. 4, p. 48-55, 2012.

MICHEL, M. C. *et al.* Association of hypertension with symptoms of benign prostatic hyperplasia. **The Journal of urology**, v. 172, n. 4 Part 1, p. 1390-1393, 2004.

MISRA, H. P; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.

MOLINA-TORRES, J; GARCÍA-CHÁVEZ, A; RAMÍREZ-CHÁVEZ, E. Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. **Journal of ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 241-248, 1999.

MOTRICH, R. D. *et al.* Implications of prostate inflammation on male fertility. **Andrologia**, v. 50, n. 11, p. e13093, 2018.

NAHAR, L; ONDER, A; SARKER, S. D. A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010–2019). **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 4, p. 413-457, 2020.

NAKAMURA, H. *et al.* Anormalidade morfológica do epitélio da próstata de ratos espontaneamente hipertensos. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 4, n. 2, p. 183-193, 1991.

NASCIMENTO, L. E. S. **Jambu (***Acmella oleracea* **(L.) R.K. Jansen) hidropônico e convencional: uma comparação baseada nas propriedades físico-químicas e composição fitoquímica**. 2019. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós graduação do Centro de Ciência Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019. Disponível em: < https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/215239/PCAL0461-D.pdf?sequence=-1&isAllowed=y > Acesso em: 26 de out. 2021

NAWASH, O. *et al.* Ethnobotanical study of medicinal plants commonly used by local bedouins in the badia region of Jordan. **Journal of ethnopharmacology**, v. 148, n. 3, p. 921-925, 2013.

NG, K. K; NG, F. C. The use of antimuscarinics, phosphodiesterase type V inhibitors and phytotherapy for lower urinary tract symptoms in men. **Asian Journal of Urology**, v. 4, n. 3, p. 191-194, 2017.

NG, M; BARADHI, K. M. Benign prostatic hyperplasia. 2020. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558920/> Acesso em 22 out. 2021.

NICKEL, J. C. *et al.* Chronic prostate inflammation predicts symptom progression in patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain. **The Journal of urology**, v. 198, n. 1, p. 122-128, 2017.

NICKEL, J. C. *et al.* Comparison of dutasteride and finasteride for treating benign prostatic hyperplasia: the Enlarged Prostate International Comparator Study (EPICS). BJU international, v. 108, n. 3, p. 388-394, 2011.

NOMURA, E. C. O. *et al.* Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 583–589, 2013.

NUNZIO, C. *et al.* A inflamação é um alvo do tratamento médico para os sintomas do trato urinário inferior associados à hiperplasia benigna da próstata. **Jornal Mundial de Urologia**, p. 1-9, 2020.

OATES, L. The complementary approach: Complementary medicines for benign prostatic hyperplasia. **Australian Pharmacist**, v. 35, n. 5, p. 56-59, 2016.

OHKAWA, H; OHISHI, N; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

PAGANO, E. *et al.* Phytotherapy of benign prostatic hyperplasia. A minireview. Phytotherapy research, v. 28, n. 7, p. 949-955, 2014.

PARSONS, J. K. Modifiable risk factors for benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms: new approaches to old problems. The Journal of urology, v. 178, n. 2, p. 395-401, 2007.

PARSONS, J. K; BERGSTROM, J; BARRETT-CONNOR, E. Lipids, lipoproteins and the risk of benign prostatic hyperplasia in community-dwelling men. BJU international, v. 101, n. 3, p. 313-318, 2008.

PATERNITI, I. *et al.* Effects of different natural extracts in an experimental model of benign prostatic hyperplasia (BPH). **Inflammation Research**, v. 67, n. 7, p. 617-626, 2018.

PERETTI, P. **Screening fitoquímico das variantes paraense e amapaense de** *Acmella oleracea* **(l.) R. K. Jansen através de UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS e avaliação da atividade bactericida e antibiofilme FRENTE A** *Streptococcus mutans*. 103 f. Dissertação de mestrado (Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2020.

PERETTI, P. *et al*. Spilanthol content of *Acmella oleracea* subtypes and their bactericide and antibiofilm activities against Streptococcus mutans. **South African Journal of Botany**, v. 143, p. 17-24, 2021.

PEREZ, D. M. Current Developments on the Role of α1-Adrenergic Receptors in Cognition, Cardioprotection, and Metabolism. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 2021.

PINHEIRO, M. T. **Avaliação fitoquímica e da atividade antioxidante, citotóxica, inseticida e repelente de extratos vegetais das folhas de** *Acmella oleracea* **(L.) R. K. Jansen,** *Acmella ciliata (Kunth) Cass* e *Tithonia diversifloia* **(Hemsl.)** ***A. Gray*** **(Asteraceae) contra Aedes aegypti**. Tese (Doutorado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal- BIONORTE. Macapá, 2016. Disponível em: <https://www2.unifap.br/bionorte/files/2019/02/TESE-FINAL-COMPLETA-Mayara-Tania-Pinheiro.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2021.

PINHEIRO, M. T. *et al.* Antioxidant and cytotoxic potential of aqueous crude extract of *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, v. 7, n. 12, p. 562–569, 2015. Disponível em: <https://www.jocpr.com/articles/antioxidant-and-cytotoxic-potential-of-aqueous-crude-extract-of-acmella-oleracea-l-r-k-jansen.pdf> Acesso em 26 de out. 2021.

POKHREL, L. R.; DUBEY, B. Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. **Science of the Total Environment**, v. 452, p. 321-332, 2013.

PRACHAYASITTIKUL, S. *et al.* Bioactive Metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. Molecules, [s.l.], v. 14, n. 2, p.850-867, 19 fev. 2009.

RAJESH, Y. *et al.* Immunomodulatory potential of ethanol extract of *Spilanthus acmella* leaves. **Int J Biol Med Res**, v. 2, n. 3, p. 631-635, 2011

REBILLARD, A. *et al.* Prostate cancer and physical activity: adaptive response to oxidative stress. **Free radical biology and medicine**, v. 60, p. 115-124, 2013.

REVILLA, J. **Plantas úteis da bacia amazônica**. Manaus: SEBRAE-AM/INPA, v. I e II, 2002. Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=671843&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22REVILLA,%20J.%22&qFacets=autoria:%22REVILLA,%20J.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>. Acesso em: 02 jun. 2020.

RIBEIRO, J. C; CARVALHO, A. P; SANTOS, A. R. Terapeutica actual da Hipertrofia Benigna da Prostata. Acta Urol, v. 23, n. 1, p. 93-9, 2006.

RIOS, M. Y; AGUILAR-GUADARRAMA, A. B; GUTIÉRREZ, M. DEL C. Analgesic activity of affinin, an alkamide from Heliopsis longipes (Compositae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 364–367, 2007.

RISBRIDGER, G. P; TAYLOR, R. A. Physiology of the male accessory sex structures: the prostate gland, seminal vesicles, and bulbourethral glands. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. Academic Press, v. 1, p. 1149-1172, 2006.

RITTER, M. R. *et al.* Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 51-62, 2002.

RITTMASTER, R. S. *et al.* Differential effect of 5α-reductase inhibition and castration on androgen-regulated gene expression in rat prostate. **Molecular Endocrinology**, v. 5, n. 7, p. 1023-1029, 1991

ROCHA, C. F. *et al.* Action of the hydroethanolic extract of the flowers of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen on the reproductive performance of Wistar females rats: a popular female aphrodisiac from the Amazon. **Journal of ethnopharmacology**, v. 214, p. 301-308, 2018.

RODRIGUES, S. F. M. *et al.* Saber feminino plantas medicinais, identificação, cultivo e uso. Cadernos de Agroecologia, v. 15, n. 2, 2020.

RODRIGUES, U. S. *et al.* Doxazosin for treatment of hypertensive patients with benign prostatic hyperplasia. 2007.

ROEHRBORN, C. G. Pathology of benign prostatic hyperplasia. International Journal of Impotence Research, v. 20, n. SUPPL. 3, 2008.

ROEHRBORN, C. G. Lower urinary tract symptoms, benign prostatic hyperplasia, erectile dysfunction, and phosphodiesterase-5 inhibitors. **Reviews in Urology**, v. 6, n. 3, p. 121, 2004.

ROMÃO, N. F. *et al.* Análise do perfil fitoquímico, potencial antioxidante do extrato das flores de *Spilanthes acmella*. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 2, n. 2, 2015.

RONDANELLI, M. *et al. Acmella oleracea* para controle da dor. **Fitoterapia**, v. 140, p. 104419, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X19317149?casa_token=aWccajs-fZwAAAAA:LKOR9IxJlrKPFNUHHgmU8acRrE8aB0lTDLoM9vbdGbb-nVUhmRwe8xH5q-eez89qG7Sw9Z_JVds> Acesso em: 26 de out. 2021

RUSSO, G. I; URZÌ, D; CIMINO, S. Epidemiology of LUTS and BPH. In: **Lower Urinary Tract Symptoms and Benign Prostatic Hyperplasia**. Academic Press, p. 1-14, 2018

SALINAS-CASADO, J. *et al.* Revisão sobre a experiência e evidências do *Pygeum africanum* en Urología. **Actas urologicas espanolas**, v. 44, n. 1, p. 13, 2020.

SANTOS, H. O; HOWELL, S; TEIXEIRA, F. J. Beyond tribulus (*Tribulus terrestris* L.): The effects of phytotherapics on testosterone, sperm and prostate parameters. **Journal of ethnopharmacology**, v. 235, p. 392-405, 2019.

SAPONARO, M. *et al. Serenoa repens* and *Urtica dioica* fixed combination: In-vitro validation of a therapy for benign prostatic hyperplasia (BPH). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 9178, 2020.

SARMA, A. V; WEI, J. T. Benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 3, p. 248-257, 2012.

SAVIC, S. *et al.* Identification and photostability of N-alkylamides from *Acmella oleracea* extract. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, p. 113819, 2020.

SCHWINN, D. A; ROEHRBORN, C. G. α1-Subtipos de adrenoreceptores e sintomas do trato urinário inferior. **International Journal of Urology**, v. 15, n. 3, p. 193-199, 2008.

SCOTT, E; MUNKLEY, J. Glycans as biomarkers in prostate cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 6, p. 1389, 2019.

SHAPIRO, E. *et al.* The relative proportion of stromal and epithelial hyperplasia is related to the development of symptomatic benign prostate hyperplasia. **The Journal of urology**, v. 147, n. 5, p. 1293-1297, 1992.

SHARMA, R; ARUMUGAM, N. N-alkylamides of Spilanthes (syn: Acmella): Structure, Purification, Characterization, Biological Activities and Applications–A review. **Future Foods**, p. 100022, 2021

SHARMA, V. *et al. Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC–MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. **Phytomedicine**, v. 18, n. 13, p. 1161-1169, 2011.

SHIMIZU, S. *et al.* Lower urinary tract symptoms, benign prostatic hyperplasia/benign prostatic enlargement and erectile dysfunction: are these conditions related to vascular dysfunction?. **International Journal of Urology**, v. 21, n. 9, p. 856-864, 2014

SHIMIZU, S. *et al.* Protective effects of tadalafil on prostatic hyperplasia in spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 882, p. 173313, 2020.

SHIMIZU, S. *et al.* Therapeutic effects of losartan on prostatic hyperplasia in spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 266, p. 118924, 2021.

SHIRAI, T. *et al.* Experimental prostate carcinogenesis—rodent models. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 462, n. 2-3, p. 219-226, 2000.

SHOCK, N. W. Normal human aging: The Baltimore longitudinal study of aging. 1984.

SILVA GONÇALVES, J. J. Relatório de Estágio realizado na Farmácia Avenida-Barcelos. 2019. Disponível em: < https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/121209/2/343265.pdf> Acesso em: 21 out. 2021.

SILVA, E. C. A. *et al*. Ação Dos Fitoesteróis nas Doenças Cardiovasculares. **International Journal of Nutrology**, v. 11, n. S 01, p. 62, 2018.

SILVA, O. N. **Terapêutica médica na hiperplasia benigna da próstata**: artigo de revisão. 2009. 29 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2009. Disponível em: <https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/15948/1/Terap%c3%aautica%20m%c3%a9dica%20na%20hiperplasia%20benigna%20da%20pr%c3%b3stata.pdf> Acesso em: 26 nov. 2021.

SLAWIN, K. M. The medical therapy of prostatic symptoms study: what will we learn?. **Reviews in urology**, v. 5, n. Suppl 4, p. S42, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1502359/> Acesso em 03 mar. 2020.

SMIRK, F. H; HALL, W. H. Inherited hypertension in rats. **Nature**, v. 182, n. 4637, p. 727-728, 1958.

SONG, G. *et al*. Sintomas do trato urinário inferior e disfunção sexual masculina: uma revisão sistemática e meta-análise. **Fronteiras na medicina**, v. 8, 2021.

SOUSA, R. S. *et al.* Tratamento do câncer de próstata: radioterapia, quimioterapia e plantas medicinais como alternativa terapêutica. Revista Eletrônica Acervo Saúde, v. 11, n. 9, p. e537, 2019.

SOUZA, G.C. *et al.* Acute toxicity of the hydroethanolic extract of the flowers of *Acmella oleracea* L. in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and histopathological studies. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 4, p. 173, 2019.

SQUADRITO, F; MORGIA, G. A associação de *Serenoa repens*, licopeno e selênio é superior a *Serenoa repens* sozinho na redução da hiperplasia benigna da próstata. 2011. Disponível em: < https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.5301/RU.2011.8520>. Acesso em 21 out. 2021.

STAMATIOU, K. *et al*. *Serenoa repens* and *Pygeum Africanum* in the treatment of BPH. **Hellenic Urology**, Piraeus, v. 31, n. 3, p. 33-40, abr. 2019. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Konstantinos-Stamatiou/publication/337570237_Serenoa_repens_and_Pygeum_Africanum_in_the_treatment_of_BPH/links/5df019ec4585159aa473ed85/Serenoa-repens-and-Pygeum-Africanum-in-the-treatment-of-BPH.pdf>. Acesso em: 26 out. 2021.

STEIN, R. *et al.* Chymase inhibition: A key factor in the anti-inflammatory activity of ethanolic extracts and spilanthol isolated from *Acmella oleracea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 270, p. 113610, 2021

STEINER, G. *et al.* Phenotype and function of peripheral and prostatic lymphocytes in patients with benign prostatic hyperplasia. **The Journal of urology**, v. 151, n. 2, p. 480-484, 1994.

SUNDAR, S. *et al.* Evaluation of In-vitro Anti-inflammatory Activity of Aqueous Extract of *Andrographis paniculata*. **Global Journal of Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 289-295, 2015.

TABOGA, S. R; VILAMAIOR, P. S. L; GÓES, R. M. Modulação androgênica e estrogênica na próstata: uma abordagem em modelos experimentais de roedores com enfoque na biologia estrutural. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 946-955, 2009.

TAGHIZADEH RABE, S. Z. *et al.* Antiproliferative effects of extracts from Iranian Artemisia species on cancer cell lines. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 9, p. 962-969, 2011.

TAKAYAMA, K; INOUE, S. Transcriptional network of androgen receptor in prostate cancer progression. **International Journal of Urology**, v. 20, n. 8, p. 756-768, 2013.

TEIXEIRA, I. D; SANCHES, A. M; FALCÃO, G. Um caso clínico de sintomas urinários baixos. **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**, v. 33, n. 2, p. 134-40, 2017.

THOMPSON, I. M. *et al.* Erectile dysfunction and subsequent cardiovascular disease. Jama, v. 294, n. 23, p. 2996-3002, 2005.

TORTORA, G. J; DERRICKSON, B. **Principles of Anatomy and Physiology**: system male genital. 15. ed. Valencia: Wiley, 2017. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=ptPT&lr=&id=aSaVDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR4&dq=Principles+of+Anatomy+and+Physiology:+System+male+genital&ots=le1oYM3zzO&sig=ei0p7ZWZfZYXbGka5g2e__jBDjM&redir_esc=y#v=onepage&q=Principles%20of%20Anatomy%20and%20Physiology%3A%20System%20male%20genital&f=true>. Acesso em: 26 out. 2021.

UNTERGASSER, G; MADERSBACHER, S; BERGER, P. Benign prostatic hyperplasia: Age-related tissue-remodeling. **Experimental Gerontology**, v. 40, n. 3, p. 121–128, 2005.

UTHPALA, T. G. G; NAVARATNE, S. B. *Acmella oleracea* plant; identificação, aplicações e uso como uma fonte emergente de alimentos - revisão. **Food Reviews International**, v. 37, n. 4, p. 399-414, 2021.

VAN-ASSELDONK, B; BARKIN, J; ELTERMAN, D. S. Medical therapy for benign prostatic hyperplasia: a review. **Can J Urol**, v. 22, n. Suppl 1, p. 7-17, 2015.

VANAMALA, U. *et al.* An updated review on diuretic plants-2012. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive, v. 3, p. 29-31, 2012. Disponível em: <https://www.ijpba.info/ijpba/index.php/ijpba/article/view/531/357>. Acesso em: 18 ago. 2020.

VELA-NAVARRETE, R. *et al.* BPH and inflammation: pharmacological effects of Permixon on histological and molecular inflammatory markers. Results of a double blind pilot clinical assay. **European urology**, v. 44, n. 5, p. 549-555, 2003.

VELA-NAVARRETE, R. *et al*. Efficacy and safety of a hexanic extract of *Serenoa repens* (Permixon®) for the treatment of lower urinary tract symptoms associated with benign prostatic hyperplasia (LUTS/BPH): systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies. **Bju International,** v. 122, n. 6, p. 1049-1065, 2018.

VÉLEZ-VINTIMILLA, P. J. Prevalência de complicações e fatores associados à prostatectomia aberta em pacientes do Hospital Enrique Garcés, Quito - Equador. Período 2016–2018. 2019.

VERZE, P; CAI, T; LORENZETTI, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. **Nature Reviews Urology**, v. 13, n. 7, p. 379, 2016.

VICKMAN, R. E. *et al.* The role of the androgen receptor in prostate development and benign prostatic hyperplasia: A review. **Asian Journal of Urology**, v. 7, n. 3, p. 191-202, 2020.

VIGNOZZI, L. *et al.* PDE5 inhibitors blunt inflammation in human BPH: a potential mechanism of action for PDE5 inhibitors in LUTS. The Prostate, v. 73, n. 13, p. 1391-1402, 2013.

VILAMAIOR, P. S. L. *et al.* Regulação hormonal e interações células-matriz extracelular na próstata ventral de ratos. 2003.

VILAMAIOR, P. S. L; TABOGA, S. R.; CARVALHO, H. F. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 288, n. 8, p. 885-892, 2006.

WANG, R. *et al.* A phytosterol enriched refined extract of Brassica campestris L. pollen significantly improves benign prostatic hyperplasia (BPH) in a rat model as compared to the classical TCM pollen preparation Qianlie Kang Pule'an Tablets. Phytomedicine, v. 22, n. 1, p. 145-152, 2015.

WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Lab Invest**, v. 12, p. 131-155, 1963.

WEIHUA, Z. *et al.* A role for estrogen receptor β in the regulation of growth of the ventral prostate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 11, p. 6330-6335, 2001.

WEINTRAUB, L. *et al.* Antioxidant Activity and Antiproliferative Effects of *Acmella alba, Acmella oleracea*, and *Acmella calirrhiza.* **The FASEB Journal**, v. 34, n. S1, p. 1-1, 2020.

WEN, S. *et al.* Stromal androgen receptor roles in the development of normal prostate, benign prostate hyperplasia, and prostate cancer. **The American journal of pathology**, v. 185, n. 2, p. 293-301, 2015.

WONGSAWATKUL, O. *et al.* Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. **International journal of molecular sciences**, v. 9, n. 12, p. 2724-2744, 2008.

WU, L. *et al.* Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 7, p. 2341-2349, 2008

YAMORI, Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. **Handbook of hypertension**, v. 4, p. 224-239, 2013.

YANG, B; YANG, Y. Advances in studies on material basis of pollen used for treatment of prostatic diseases [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, v. 1, 1994.

YONO, M. *et al.* Effects of doxazosin on blood flow and mRNA expression of nitric oxide synthase in the spontaneously hypertensive rat genitourinary tract. **Life sciences**, v. 81, n. 3, p. 218-222, 2007.

ZELIOLI, I. A. M. *et al*. Extração Supercrítica de Espilantol em leito fixo a partir de jambu (*Acmella oleracea* (J.) RK Jansen). **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 1884-1889, 2015.

ZIHLIF, M. *et al.* Screening the antiangiogenic activity of medicinal plants grown and sold in Jordan. **Planta medica**, v. 78, n. 03, p. 297-301, 2012.

ANEXOS

A – PARECER Nº 13/2019 – HAMAB/NUBIO/IEPA

Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá – IEPA
Núcleo de Biodiversidade – NUBIO
Herbário Amapaense - HAMAB

PARECER

Parecer Nº 13/2019 – HAMAB/NUBIO/IEPA Macapá, 20 de setembro de 2019.

De: **Tonny David Santiago Medeiros – Curador HAMAB**
Para: **Paulo Peretti Junior – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amapá**
Assunto: **Identificação Taxonômica e Depósito de Amostras Botânicas**

Prezado Senhor,

Conforme procedimentos adotados à identificação taxonômica do material enviado a este herbário seguem as informações de depósito no HAMAB:

Família	Nome Científico	Coletor(res) / Nº	Local da Coleta / Data de coleta
Asteraceae	*Acmella oleracea* (L.) RKJansen	P. PERETTI / 01, 02	Brasil, Amapá, Macapá, APA da Fazendinha / 05.07.2019
Forma de Mencionar em Monografias e Manuscritos para Publicações			
Acmella oleracea (L.) RKJansen. **Material examinado**: Brasil, Amapá, Macapá, APA da Fazendinha, 05.VII.2019, *P. PERETTI*, 01 e 02 (HAMAB).			

Atenciosamente,

Tonny D.S.Medeiros
Inst.Peq.Cient.e Téc.
do Estado do Amapá - IEPA
Pesquisador

Me. Tonny David Santiago Medeiros
Curador do Herbário Amapaense – HAMAB/NUBIO/IEPA
Decreto Nº 0125 – 23.01.2018/IEPA/GEA

B – CADASTRO Nº A0A8024 DO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PRATROMÔNIO GENÉTICO

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

Certidão

Cadastro nº A0A8024

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	**A0A8024**
Usuário:	**MAYARA TANIA PINHEIRO**
CPF/CNPJ:	**658.503.603-44**
Objeto do Acesso:	**Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso:	**Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie
Acmella Acmella oleracea

Título da Atividade:	**ESTUDO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE PLANTAS MEDICINAIS AMAZÔNICAS: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIINFLAMATÓRIA IN VITRO E MICROBIOLÓGICA.**

Equipe	
MAYARA TANIA PINHEIRO	**Unifap**
fernanda cristina alcantara dos santos	**UFG**
Esther de Sousa Figueredo	**UFG**
EMANUELLE TAVARES RODRIGUES	**UNIFAP**
Paulo Peretti Junior	**UNIFAP**

Parceiras Nacionais
01.567.601/0001-43 / Universidade Federal de Goiás

Data do Cadastro:	**05/12/2018 12:15:33**
Situação do Cadastro:	**Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **15:41** de **12/02/2020**.

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

C – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA. PROTOCOLO Nº 065/19

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA

UFG

C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada **"Efeitos do extrato etanólico do Jambu (*Acmella oleracea*) na prevenção e tratamento da hiperplasia benigna prostática em ratos SHR"**, registrada com o protocolo **nº 065/19**, sob a responsabilidade de **Fernanda Cristina Alcantara dos Santos** e **Esther de Souza Figueredo** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de **16/09/2019.**

- Finalidade: ( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 16/09/2019 a 30/04/2023
- Espécie/linhagem/raça: Rattus novergicus/SHR e Wistar
- Nº de animais autorizados: 40 Wistar e 40 SHRs
- Peso/Idade: 60 e 120 dias, 200 e 300g aproximadamente
- Sexo: machos
- Origem (fornecedor): Biotério Central UFG

Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG