

Karina Cristina Rodrigues Baptista

Avaliação do efeito do açaí (*Euterpe oleracea*) em modelo de endometriose, e descrição dos dados de toxicidade e do efeito anticancerígeno do açaí em modelos experimentais

Rio de Janeiro

2018

Karina Cristina Rodrigues Baptista

Avaliação do efeito do açaí (*Euterpe oleracea*) em modelo de endometriose, e descrição dos dados de toxicidade e do efeito anticancerígeno do açaí em modelos experimentais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, do Departamento de Toxicologia, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Saúde Pública e Meio Ambiente. Subárea de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientadora: Jamila Perini

Co-orientador: Daniel Machado

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

B222a Baptista, Karina Cristina Rodrigues.
Avaliação do efeito do açaí (*Euterpe oleracea*) em modelo de endometriose, e descrição dos dados de toxicidade e do efeito anticancerígeno do açaí em modelos experimentais / Karina Cristina Rodrigues Baptista. -- 2018.
126 f. ; il. color. , tab.

Orientador: Jamila Perini.
Coorientador: Daniel Machado.
Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2018.

1. Endometriose - terapia. 2. Euterpe. 3. Neoplasias.
4. Toxicologia. 5. Tratamento Farmacológico. I. Título.

CDD – 22.ed. – 618.1

Karina Cristina Rodrigues Baptista

Avaliação do efeito do açaí (*Euterpe oleracea*) em modelo de endometriose, e descrição dos dados de toxicidade e do efeito anticancerígeno do açaí em modelos experimentais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, do Departamento de Toxicologia, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Saúde Pública e Meio Ambiente. Subárea de concentração: Toxicologia Ambiental.

Aprovada em: 28/02/2018

Banca examinadora

Dra Nathalia de Oliveira Meireles da Costa – Instituto Nacional do Câncer

Dr Arnaldo César Couto – Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

Dra Jamila Alessandra Perini - Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (Orientadora)

Rio de Janeiro

2018

Dedico esse trabalho a quem esteve sempre ao meu lado, minha família, em especial meus pais Roberto e Vânia e minha irmã Erika

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu melhor amigo, por estar sempre me guiando, protegendo e nunca me deixando desistir, por todas as coisas boas que me aconteceram até hoje e por mais essa conquista.

A minha mãe, Vania, mulher de fé, sempre pedindo a Deus por mim. Faltam palavras para agradecer todo amor, ensinamentos, broncas e especialmente princípios que a mim foram passados. Você é tudo pra mim, sem você ao meu lado com certeza não teria chegado até aqui. Obrigada também paciência e colo nos tempos difíceis. Te amo demais.

Ao meu pai Roberto, pela dedicação em me transformar no que sou hoje. Você com certeza é um exemplo para mim. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Te amo demais e espero um dia retribuir a mesma altura. Você é tudo para mim.

A minha querida avó Wanda, que com todas as dificuldades, nunca deixou de estar ao lado e ajudar todos os filhos e netos. Aquela que cuidou a vida inteira de mim, obrigada por simplesmente tudo o que significa na minha vida. Quero ser só um pouco do que você foi e continua sendo até hoje. Você faz parte do meu crescimento. Te amo. E ao meu querido avô Gercilei (*in memoriam*) por tudo. O senhor faz muita falta para mim, me faltam palavras e sobram lágrimas. Por toda dedicação para ver um sorriso no meu rosto. Só consigo lembrar os momentos bons que tive com você. Sinto saudades.

A minha irmã Erika, por todos os momentos bons que vivemos juntas e por tudo o que representa para mim. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos bons e ruins e principalmente por se orgulhar das minhas conquistas. Te amo demais.

Ao Gabriel, obrigada simplesmente por tudo. Obrigada por se esforçar tanto para me fazer feliz. Você é um presente de Deus e eu sou grata até o fim. Obrigada por perder horas do seu sono me ajudando. Tenho certeza que essa conquista também é sua. Te amo demais.

A minha orientadora Jamila, por todos os ensinamentos e incentivos. Obrigada por tudo o que significa para mim e por todos esses anos em que eu venho aprendendo mais e mais. Obrigada por confiar em mim e me permitir esses dois anos de mestrado. Com certeza, termino esse ciclo, agradecida por tudo o que eu cresci após seus ensinamentos. Nunca esquecerei o que já fez por mim.

Ao meu orientador Daniel, grande vascaíno, que nos primeiros dias de UEZO me convidou para fazer IC desde quando o laboratório era uma caixinha. Obrigada por todos os ensinamentos, orientações, incentivos e por tudo o que um orientador pode ser. Obrigada também por me permitir crescer junto com o laboratório. Você com certeza ficará marcado na minha vida. Toda bagagem que eu possa carregar sobre endometriose, é graças a você. Obrigada por tudo.

Aos meus colegas de laboratório, Erika, Jessica Perini, Jessica Vilarinho, Lucas, Mayara, Mirla e Thais. Obrigada pela ajuda, apoio e todos os momentos bons vividos. Erika, obrigada pela sua amizade e pelas inúmeras ajudas no nosso grupo, que Miguel venha com muita saúde e se torne o novo mascote desse laboratório. Lucas e Mirla, um agradecimento especial por nos ajudar tanto nos momentos difíceis de biotério. Amo vocês!

A minha amiga Jéssica Perini, que é um presente da UEZO para mim. Que essa amizade dure para sempre. Obrigada pela eterna ajuda em torno do artigo do açai, experimentos, finais de semana e especialmente pelos momentos de hambúrguer e brownie já vividos. Conte sempre comigo e obrigada por me permitir fazer parte da sua vida.

A minha amiga Jessica Vilarinho, pelos anos de amizade no laboratório e principalmente pelo dom da palavra que você tem. Você é ungida por Deus e eu sou grata por fazer parte da sua vida e poder sempre ouvir algo bom de você.

A todos os meus amigos e familiares que sempre estiveram por perto, me apoiando e me dando toda a força que eu precisava.

Aos professores da UEZO e da ENSP que me ajudaram a trilhar esse caminho e chegar até aqui. O que aprendi esse tempo todo foi graças a vocês.

As agencias de fomento FAPERJ e CAPES.

A todos os que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse aqui e realizasse mais um sonho. E a todos que me apoiam pessoal e profissionalmente.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A endometriose é uma doença ginecológica que afeta 10% das mulheres em idade reprodutiva, causando sintomas clínicos em diferentes intensidades, prejudicando a qualidade de vida. O tratamento farmacológico baseia-se no alívio dos sintomas, uma vez que não há terapia capaz de erradicar a doença. Entre os processos envolvidos na fisiopatologia da endometriose, a angiogênese e a inflamação são fundamentais. O extrato de *Euterpe oleracea* (açai) tem sido descrito como um possível candidato para o desenvolvimento de fármacos devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito farmacológico do açai no tratamento da endometriose experimental e descrever a segurança/toxicidade e dados anticancerígenos da utilização do açai em modelos pré-clínicos. No modelo experimental de endometriose, o grupo tratado (n=10, ratos Sprague-Dawley) recebeu 200 mg/kg do extrato de açai via gavagem por 30 dias e o grupo controle (n=10) recebeu veículo. Na análise histológica foi possível observar atrofia e regressão das lesões. Análises imuno-histoquímicas (Fator de crescimento endotelial vascular - VEGF, seu receptor - VEGFR-2, ciclooxigenase-2 - COX-2, metaloproteinase-9 - MMP-9 e F4-80), expressão de PCR em tempo real (VEGF, VEGFR-2, MMP-9 e COX-2), ELISA (VEGF e PGE2), citometria de fluxo (F4-80) e bioquímica (óxido nítrico) indicaram redução significativa da angiogênese e inflamação no grupo tratado com açai quando comparada à grupo de controle. Nenhuma evidência de toxicidade foi observada na dose de açai administrada, em comparação com os controles, com base no peso, alimentação e atividade dos animais. Além disso, as células de macrófagos tratadas com açai de 20 a 40 µg/ml apresentaram redução de 50% na viabilidade celular após 24, 48 e 72 h. Uma revisão da literatura também foi realizada usando quatro bases de dados internacionais para identificar publicações que estudaram o extrato de açai utilizado em modelos animais experimentais de câncer (n=6) e/ou avaliaram a segurança/toxicidade do açai em modelos pré-clínicos (n= 3) usando um rigor metodológico (QATRS) para permitir um melhor controle de qualidade. Açai teve atividade antitumoral, reduzindo a incidência e o tamanho dos tumores e não apresentou efeitos genotóxicos. Como conclusão, é possível sugerir que o açai é eficaz no tratamento da endometriose e pode ser considerado um tratamento farmacológico promissor sem causar efeitos adversos. Além disso, sugere-se que o açai possa ser utilizado como agente seguro, quimiopreventivo e anticancerígeno.

Palavras-chave: Endometriose, *Euterpe oleracea*, Tratamento, Câncer, Toxicologia

ABSTRACT

Endometriosis is a gynecological disease that affects 10% of women on reproductive age, which causes clinical symptoms at different intensities, damaging the quality of life. The pharmacological treatment is based on the symptoms' relief, since there is no therapy capable of eradicating the disease. Among the processes involved in the pathophysiology of endometriosis, angiogenesis and inflammation are fundamental. The *Euterpe oleracea* extract (açai) has been described as a possible candidate for drug development due to its properties antioxidant, anti-inflammatory and anticancer. Therefore, the present study aimed to evaluate the pharmacological effect of açai in the treatment of experimental endometriosis and to describe the safety / toxicity and anticancer data of açai utilization in preclinical models. In the experimental model of endometriosis, the treated group (n = 10, Sprague-Dawley rats) received 200 mg / kg of the açai extract via gavage for 30 days and the control group (n = 10) received vehicle. In the histological analysis it was possible to observe atrophy and regression of the lesions. Immunohistochemical analyzes (Vascular endothelial growth factor - VEGF, VEGF receptor - VEGFR-2, cyclooxygenase-2 - COX-2, metalloproteinase-9 - MMP-9 and F4-80), real-time PCR expression (VEGF, VEGFR-2, MMP-9 and COX-2), ELISA (VEGF and PGE2), flow cytometry (F4-80) and biochemistry (nitric oxide) indicated a significant reduction of angiogenesis and inflammation in the açai treated group when compared to the control group. No evidence of toxicity was observed in the dose of açai administered, as compared to controls, based on weight, feed and activity of the animals. In addition, macrophage cells treated with 20 to 40 µg / ml açai had a 50% reduction in cell viability after 24, 48 and 72 h. A literature review was also conducted using four international databases to identify publications that studied the used of açai extract in experimental animal models of cancer (n = 6) and / or evaluated the safety / toxicity of açai in preclinical models (n = 3) using a methodological rigor (QATRS) to enable better quality control. Acai had antitumor activity, reducing the incidence and size of tumors, and did not present genotoxic effects. As a conclusion, it is possible to suggest that açai is effective in the treatment of endometriosis and can be considered a promising pharmacological treatment without causing adverse effects. In addition, it is suggested that açai may be used as a safe, chemopreventive and anticancer agent.

Keywords: Endometriosis, *Euterpe oleracea*, Treatment, Cancer, Toxicology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Histologia do útero corado com hematoxilina e eosina (HE)	16
Figura 2 Ciclo Menstrual.....	18
Figura 3 Histologia do endométrio.....	23
Figura 4 Angiogênese.....	24
Figura 5 Visão macroscópica de focos endometrióticos no peritônio.....	25
Figura 6 Fruta açaí (<i>E. oleracea</i>).....	33
Figura 7 Observações morfológicas por microscopia de contraste de fase da linhagem de macrófagos J774.G8 cultivadas em garrafa de plástico em meio RPMI 1640 (A e B)	466

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACO	Anticoncepcional Oral
ACs	Anticoncepcionais Combinados
AINES	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
CA-125	Antígeno de Câncer 125
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
DAB	Diaminobenzidina
DMPA	Acetato de Medroxiprogesterona na Forma de Depósito
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Imunoensaio enzimático
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ENA-78	Peptídeo ativador de neutrófilos derivado de células epiteliais
FLK	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
HE	Hematoxilina-Eosina
IL-6	Interleucina-6
IL-1 β	Interleucina 1B
IM	Intramuscular
IMC	Índice de Massa Corpórea
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
KDR	Receptor de Domínio de Inserção da Quinase
LH	Hormônio Luteinizante
LPS	Lipopolisacarídeo
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinase de Matriz
MTT	{Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}
NMBA	N-nitrosometilbenzilamina
NO	Óxido Nítrico

PBS	Tampão Fosfato-salino
PBS/BSA	Tampão Fosfato-salino/Albumina sérica bovina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFA	Paraformaldeído
PGE2	Prostaglandina E2
PTGS	Prostaglandina-endoperóxido sintase 2
RANTES	Regulamento na ativação em condições normais de células T expressa e segregada
RM	Ressonância Magnética
TC	Tomografia Computadorizada
TNF-alfa	Fator de Necrose Tumoral – alfa
UEZO	Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR2	Receptor 2 do Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VO	Via Oral
SOD	Superóxido Dismutase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1. ENDOMÉTRIO E O CICLO MENSTRUAL	16
2.2 ENDOMETRIOSE	18
2.2.1 Conceito e epidemiologia.....	18
2.2.2 Etiologia da endometriose.....	20
2.2.3 Classificação e diagnóstico	21
2.2.4 Angiogênese e inflamação	23
2.2.5 Tratamento da endometriose	28
2.2.6 <i>Euterpe oleracea</i> : Efeito farmacológico	32
2.2.7 <i>Euterpe oleracea</i> : Toxicologia.....	35
3. JUSTIFICATIVA	37
4. OBJETIVOS	38
4.1. Geral.....	38
4.2. Específicos	38
5. METODOLOGIA.....	39
5.1 MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSE	39
5.1.1 Tratamento com extrato de <i>E. oleracea</i> em modelo experimental de endometriose	40
5.1.2 Análise dos efeitos farmacológicos do açaí em modelo experimental de endometriose	40
5.2 METODOLOGIA DA REVISÃO SISTEMÁTICA	47
5.2.1. Estratégia de Pesquisa	47
5.2.2. Critérios de inclusão e exclusão	47
5.2.3. Extração de dados.....	47
5.2.4. Avaliação de qualidade	47
6. RESULTADOS	49
6.1 <i>E. oleracea</i> extract (açaí) is a promising novel pharmacological therapeutic treatment for experimental endometriosis	49
6.2 Anticancer potential, molecular mechanisms and toxicity of <i>Euterpe oleracea</i> extract (Açaí): A systematic review	67
7. DISCUSSÃO	99

8. CONCLUSÃO.....	107
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	108
10. ANEXOS.....	126

1. INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença ginecológica caracterizada pela presença de endométrio funcional glandular e/ou estromal fora da cavidade uterina (GALLE et al., 1989; GIUDICE et al., 2010). É uma doença inflamatória que afeta 5-10% das mulheres em idade reprodutiva podendo causar dor pélvica crônica, dismenorreia e infertilidade, resultando em uma redução da qualidade de vida (BULUN et al., 2009; SIMOENS et al., 2012).

A etiologia da endometriose ainda não está totalmente esclarecida, apesar de muitas teorias sobre a gênese da doença já terem sido descritas (MACER et al., 2012). Até hoje, a teoria mais aceita é a descrita por Sampson, em 1927, em que tecidos endometriais, por meio de um fluxo menstrual retrógrado, ultrapassam a cavidade uterina, chegando à cavidade peritoneal, sofrendo proliferação e crescimento em sítios ectópicos (SAMPSON et al., 1927). Já está bem elucidado que para o desenvolvimento da endometriose, vasos sanguíneos oriundos de vasos pré-existentes são recrutados para o local da lesão que necessita de oxigênio e nutrientes para se estabelecer (LASCHKE et al., 2018; GILABERT-ESTELLES et al., 2007; MACHADO et al., 2008; MCLAREN et al., 2000). Esse fenômeno é denominado angiogênese. Muitos fatores angiogênicos estão envolvidos no desenvolvimento da endometriose, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), citocinas e prostaglandinas (LASCHKE et al., 2007a; PODGAEC et al., 2007; WU et al., 2007). Alguns estudos mostraram que lesões de endometriose exibem uma aumentada expressão de ciclooxygenase-2 (COX-2), enzima produzida a partir de fatores pró-inflamatórios, quando comparada com endométrio eutópico (CHISHIMA et al., 2002; WANG et al., 2012) sendo a angiogênese e a inflamação, cruciais na fisiopatologia da doença. (LASCHKE et al., 2007b; MATSUZAKI et al., 2004; OTA; TANAKA et al., 2001).

O diagnóstico definitivo da endometriose é feito por métodos invasivos como a videolaparoscopia, seguida de biópsia para confirmação histológica da doença (BEDAIWY et al., 2002; KHAN et al., 2002; PODGAEC et al., 2007). Esse procedimento permite ao ginecologista não só localizar os focos da lesão, como também removê-los por completo durante o ato cirúrgico (KHO et al., 2012). Além de invasivo e de alto custo, é observada uma recorrência das lesões endometrióticas, em média, de 3 a 5 anos após o procedimento cirúrgico (VERCELLINI et al., 2009a).

O tratamento clínico é baseado no alívio dos sintomas pelo uso da hormônio-terapia incluindo contraceptivos orais, progestágenos e agonistas do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), reduzindo os níveis de estrogênio (ABRAO et al., 2000; GIUDICE et al., 2010; RUHLAND et al., 2011; SEO et al., 2010). Contudo, o tratamento hormonal apresenta inúmeros efeitos adversos e não é capaz de erradicar a doença (SCHRAGER et al., 2013; SOARES et al., 2012), sendo necessária a busca de estratégias eficazes para tratar clinicamente a doença.

Diversos estudos têm mostrado o potencial terapêutico da *Euterpe oleracea*, uma planta conhecida popularmente como açaí, encontrada na América Central e do Sul. O açaí possui propriedades farmacológicas que estão relacionadas com a sua atividade antiproliferativa, anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena e efeitos cardioprotetores (DE MOURA et al., 2011, 2012; HEINRICH et al., 2011; SCHAUSS et al., 2006a; SILVA et al., 2014; STONER et al., 2010; CHOI et al., 2017). Algumas pesquisas demonstraram o efeito do açaí na inibição das enzimas ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2), *in vitro* e *in vivo*, sugerindo uma atividade anti-inflamatória (DE MOURA et al., 2011, 2012; SCHAUSS et al., 2006a). O efeito antiangiogênico e anticancerígeno do açaí foi observado pela inibição de VEGF em células de adenocarcinoma de cólon humano (DIAS et al., 2014). Um estudo recente avaliou o potencial genotóxico do açaí em modelo experimental com três diferentes doses utilizando ensaio cometa e teste de micronúcleos a fim de observar possíveis danos ao DNA, porém nenhum efeito de toxicidade foi observado (MARQUES et al., 2016).

Portanto, considerando que a endometriose é uma doença inflamatória e dependente de angiogênese, que possui um tratamento clínico ineficaz e com efeitos adversos, e que o tratamento cirúrgico é invasivo e oneroso, surge, a possibilidade de avaliar o efeito farmacológico do açaí no tratamento da endometriose experimental bem como, descrever as informações disponíveis na literatura científica em relação aos dados da segurança/toxicidade e anticancerígeno da utilização do açaí em modelos pré-clínicos (*in vivo*) utilizando roedores.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. ENDOMÉTRIO E O CICLO MENSTRUAL

O útero é constituído por três camadas: perimétrio (externa), miométrio (intermediária) e endométrio (interna) (Figura 1). O perimétrio apresenta uma camada de tecido conjuntivo, fortemente acoplado ao miométrio e formado por mesotélio, porém existem duas zonas que podem separar miométrio e perimétrio com facilidade. O miométrio é a camada mais espessa do útero, formado por feixes de fibras musculares lisas separadas por tecido conjuntivo. Essas fibras formam feixes dispostos em três camadas: interna, média (grande quantidade de vasos sanguíneos) e externa. O endométrio (mucosa de revestimento do útero) é constituído por um epitélio simples cilíndrico (células cilíndricas secretoras não-ciliadas e células ciliadas) e uma lâmina própria (glândulas tubulosas simples) (CONCEIÇÃO; SILVA, 2006).

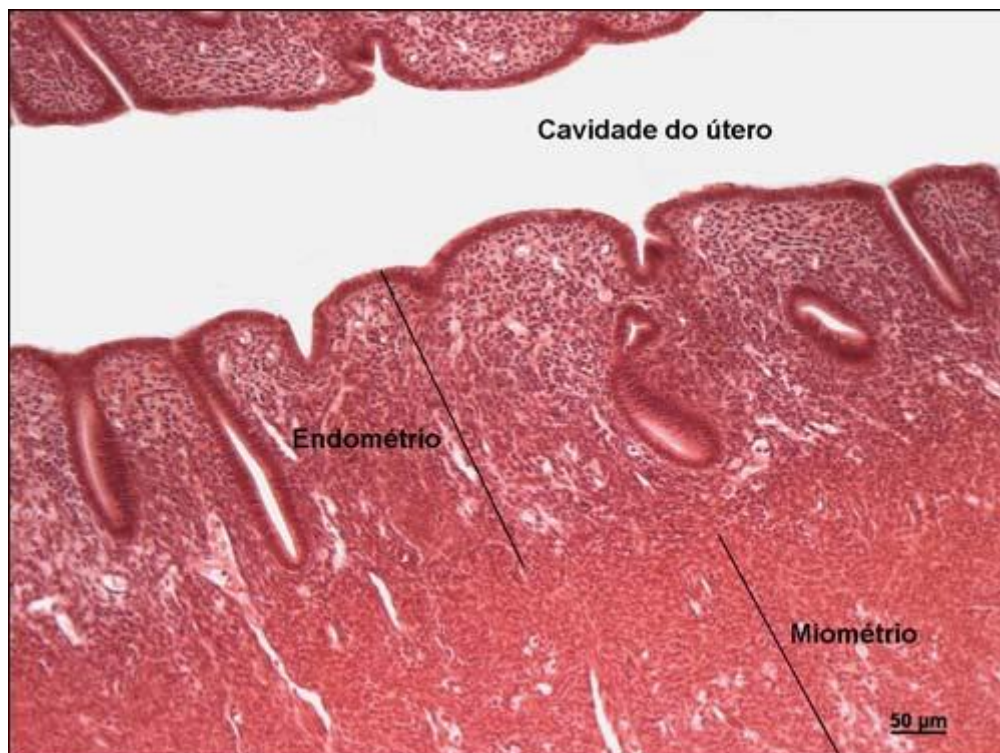


Figura 1 Histologia do útero corado com hematoxilina e eosina (HE). Fonte: UNIFESP, 2010

Devido à ação de hormônios ovarianos (estrogênio e progesterona), o endométrio sofre modificações estruturais cíclicas, que constituem o ciclo endometrial (ou ciclo menstrual). A fase proliferativa do 5º ao 14º dia (também denominada de estrogênica) e a fase secretora do 15º ao 28º dia (também denominada de progestacional) (GOLDMAN et al., 2009).

A mucosa endometrial pode ser dividida em duas camadas: funcional (descama no período menstrual), região mais superficial do endométrio e a camada basal (local em que estão presentes células que regeneram o endométrio) que constitui a base da mucosa que nunca descama. A fase proliferativa ou estrogênica é a fase do desenvolvimento dos folículos ovarianos até o estágio de ovulação (onde ocorre a produção de estrogênios). No seu início (Figura 2), as células da camada basal se proliferam, reconstituindo todo o endométrio (proliferação do tecido conjuntivo e das células epiteliais presentes no fundo dos restos das glândulas, que serão reconstituídas pelas células epiteliais, migrando e refazendo o epitélio, cessando a menstruação - toda a mucosa perdida é restaurada). As glândulas endometriais têm a forma de glândulas tubulares retas na fase proliferativa. A fase secretora ou progestacional (grande concentração de progesterona) é iniciada após a ovulação sendo dependente da formação do corpo lúteo. A progesterona estimula a secreção de glândulas endometriais (com a secreção de glicosaminoglicanos), tornando o estroma edemaciado e glândulas tortuosas. Na fase menstrual (início do ciclo menstrual, do 1º ao 4º dia) ocorre a degeneração do corpo lúteo, causando a queda dos níveis hormonais, diminuindo os estímulos hormonais sobre o endométrio. Posteriormente, ocorre a descamação da porção mais superficial do endométrio (processo envolvido pela constrição e ruptura dos vasos sanguíneos, liberando água e sangue em grande quantidade pela vagina, o que caracteriza o fluxo menstrual) (BAHAMONDES et al., 2004; BEREK et al., 2008).

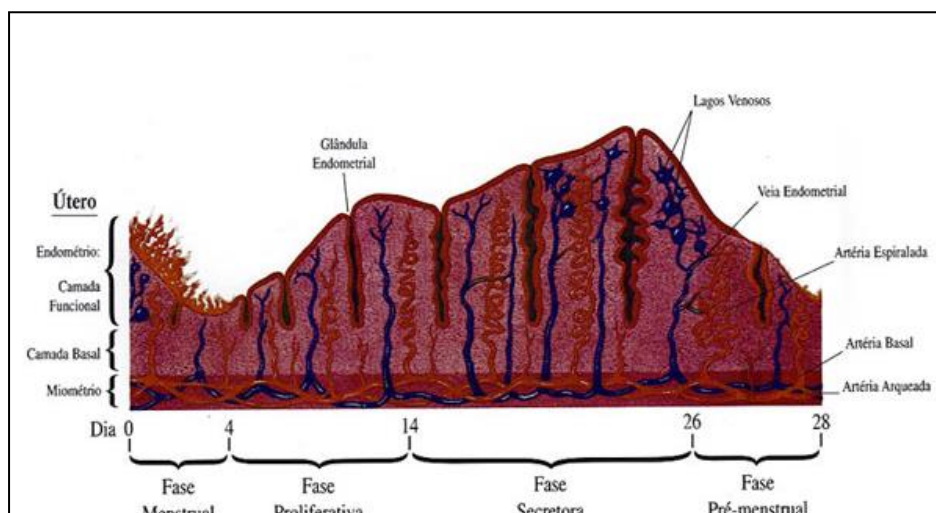


Figura 2 Ciclo Menstrual. Fonte: CONCEIÇÃO SILVA, 2006

2.2 ENDOMETRIOSE

2.2.1 Conceito e epidemiologia

A endometriose é uma doença ginecológica estrogênio-dependente caracterizada pelo crescimento de tecido endometrial, composto por elementos glandulares e/ou estromais, em localização extrauterina, acometendo principalmente ovários, peritônio pélvico, fundo de saco, face posterior do útero, cólon sigmóide e bexiga, podendo comprometer ainda apêndice, íleo, diafragma, vulva, vagina, colo do útero, septo retovaginal, parede abdominal, rins e regiões inguinais (ABRAO et al., 2003; GIUDICE et al., 2004; GIUDICE et al., 2010).

Os implantes iniciais podem ser planos, bolhas ou manchas polvilhadas na superfície pélvica. Algumas mulheres podem ter implantes de endometriose na superfície da pelve, do peritônio ou dos órgãos pélvicos, ou podem invadir o peritônio e crescerem como nódulos. Pode irritar o tecido circundante e produzir cicatrizes internas chamadas aderências que podem unir os órgãos pélvicos, cobri-los inteiramente ou envolver intestinos (ASRM, 1997).

A endometriose possui uma fisiopatologia comum com algumas neoplasias ginecológicas, como o câncer de ovário e de endométrio, e há cada vez mais evidências de que pacientes com endometriose têm risco maior de desenvolver câncer de ovário e se transformar em uma doença maligna (BORGFELDT et al., 2004; BRINTON et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2007; MODUGNO et al., 2004; NEZHAT et al., 2008; PAVONE; LYTTLE, 2015; VERIT; YUCEL, 2013).

Esta doença ginecológica pode ser encontrada em todos os níveis sociais e em todas as etnias, e afeta cerca de 5 a 10% das mulheres na população mundial, entre 15 a 45 anos (BULUN et al., 2009). Em países industrializados a endometriose é uma das principais causas de hospitalização dentre as doenças ginecológicas (VERCELLINI et al. et al., 2007). A maioria das mulheres portadoras de endometriose apresenta sintomas, que podem variar de leve a grave, sendo os principais, dismenorria durante e no final da menstruação (79-97%), dor pélvica crônica (22-69%), infertilidade (25-40%), sintomas intestinais e urinários cíclicos (29%), como dor ou sangramento ao evacuar/urinar durante o período menstrual. No entanto algumas mulheres são assintomáticas (10,7%), sendo os sintomas não necessariamente relacionados com a severidade da doença (ABRAO et al., 2003; ACIEN; VELASCO, 2013; FAUCONNIER et al., 2013; OZKAN; MURK; ARICI, 2008). Um estudo sobre diferentes características entre 1000 mulheres com endometriose da Grã-Bretanha, Irlanda e Estados Unidos descreveu que cerca de 70% delas relataram pelo menos dois dos três tipos de dores ginecológicas (SINAI et al., 2008). A dismenorréia, dor incapacitante, dor abdominal e a depressão foram identificadas como fatores preditores de mal desempenho no trabalho e em casa; além da dor incapacitante e da dispareunia promoveram prejuízos em relação aos aspectos sociais e sexuais na vida das mulheres (FOURQUET et al., 2010).

Um estudo de série de casos de 892 pacientes de São Paulo (Brasil) com endometriose verificou que 76,9% das mulheres tinham concluído o ensino médio ou superior (BELLELIS et al., 2010). Outros trabalhos corroboram com este achado, sendo o grau de escolaridade alto entre as pacientes com endometriose (HEMMINGS et al., 2004, CARDOSO JV et al., 2016). Atualmente, o uso de contraceptivos é observado com maior frequência entre as mulheres visto que essas muitas das vezes adiam a gravidez optando pela profissão, vindo a descobrir mais tardiamente a endometriose, quando tentam engravidar (ABRÃO et al., 2000).

Um estudo de coorte investigou as relações entre internações hospitalares e ambulatoriais para endometriose e o desenvolvimento de câncer de ovário e encontrou uma associação significativa entre essas doenças (RR, 1,69; IC 95%, 1,27-2,25) sugerindo que a endometriose pode predispor ao desenvolvimento do câncer de ovário com associação a neoplasias de células claras (BRINTON et al., 2005).

A endometriose também pode estar associada com diversos fatores de risco, como por exemplo, histórico familiar da doença de parentes de primeiro grau

apresentando três a nove vezes mais risco de desenvolver endometriose, fatores reprodutivos e ginecológicos quando relacionados com a idade precoce da menarca e ciclos menstruais mais longos. Além disso, hábitos pessoais como má alimentação, ausência de atividade física, fumo e consumo de álcool podem estar associados com a doença (PARAZZINI et al., 2016; VIGANO et al., 2004).

Atualmente, a endometriose é considerada um problema de saúde pública, visto que a doença provoca alterações no estado de saúde da mulher, ocasionando consequências físicas, mentais e sociais, interferindo nos relacionamentos interpessoais e conjugais, em função dos sintomas que as pacientes podem apresentar, especialmente a infertilidade (NNOAHAM et al., 2011).

2.2.2 Etiologia da endometriose

A etiologia da endometriose ainda não está totalmente esclarecida, apesar de muitas teorias sobre a gênese da doença já terem sido descritas (MACER et al., 2012). A teoria mais aceita é a descrita por Sampson, em 1927, em que fragmentos viáveis de endométrio ultrapassam a cavidade uterina, por meio de um fluxo menstrual retrógrado atingindo a cavidade peritoneal podendo se implantar, crescer e até mesmo invadir estruturas pélvicas (VERCELLINI et al., 2014). No entanto, os mecanismos celulares e moleculares ainda não são claros, visto que apesar de ser um processo fisiológico, o sistema imune pode eliminar os fragmentos endometriais impedindo que as implantações endometriais aconteçam em alguns pacientes (SIMPSON et al., 2000).

Outra teoria importante é de que a metaplasia celômica também pode contribuir para o desenvolvimento da endometriose. Essa teoria propõe que fatores bioquímicos endógenos, induzam um processo metaplásico no epitélio seroso dos ovários e nas células serosas do mesotélio, resultando no tecido endometrial (KUMAR et al., 2005).

A deficiência imunológica também é uma hipótese que tenta explicar o surgimento da endometriose. Ela propõe que mulheres com endometriose possuem um sistema imunológico defeituoso que é incapaz de reconhecer e combater os fragmentos endometriais ectópicos (AHN et al., 2015).

A herança genética destaca-se por ser uma das teorias mais recentes sobre a gênese da endometriose (KRISHNAMOORTHY; DECHERNEY, 2017). Estudos mostraram que mulheres com parente de primeiro grau afetado pela doença possui um risco sete vezes maior de desenvolver endometriose do que mulheres que não possuem história familiar da doença (BULUN et al., 2009; VIGANÒ et al., 2004). A nível

somático, a endometriose possui muitas alterações genéticas, incluindo perdas e ganhos cromossômicos, perda da função normal do alelo de um gene e instabilidade de microssatélites (GOGUSEV et al., 2000). Neste contexto, há cada vez mais evidências de que pacientes com endometriose possuem alterações moleculares em comum com algumas neoplasias e têm risco maior de desenvolver câncer e se transformar em uma doença maligna (BRINTON et al., 2005; CHANG et al., 2017).

2.2.3 Classificação e diagnóstico

A classificação da endometriose mais utilizada até hoje é a descrita pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva, em 1985. Ela foi atualizada, em 1997, propondo que a endometriose pode ser descrita pelo sistema de escores unificados em quatro estágios; I (mínimo), II (leve), III (moderado) e IV (severo), dependendo da localização, extensão e profundidade dos implantes de endometriose; presença e severidade de adesões. Nessa classificação foi introduzido o estágio mínimo da doença e as aderências passaram a ser mais detalhadas, conforme sua consistência e localização (ASRM, 1997).

Segundo Acién e Velasco, existem três formas clínicas de endometriose: a peritoneal, que corresponde à endometriose mínima ou leve, e geralmente, não é observada nenhuma progressão da doença; o cisto de endometriose ovariana, caracterizado pela presença de endometriomas que não estão aderidos, ou ligeiramente aderidos, ao lado posterior do peritônio; e endometriose infiltrativa, que não apresenta nenhuma evidência de endometriomas, porém pode resultar em um bloqueio pélvico total, com infiltração no útero, intestino e no septo reto-vaginal (é o tipo mais grave e incapacitante) (ACIÉN; VELASCO, 2013). Atualmente, a endometriose infiltrativa é considerada o tipo mais grave da doença (ABRÃO et al 2015), podendo estar associada ao endometrioma ovariano ou a endometriose infiltrativa (GONÇALVES et al., 2010). Além disso, estas lesões estão significativamente associadas com o estágio avançado da doença (III e IV) (CHAPRON et al., 2012).

Devido à grande variedade de apresentação e severidade dos sintomas, o diagnóstico da endometriose é dificultado, isso resulta em atraso no tratamento da doença. Um estudo com mulheres com endometriose de 17 a 53 anos observou um atraso no diagnóstico variando de 3 meses a 24 anos com uma média de 8,1 anos. Os relatos indicaram que muitas delas apresentaram um mal diagnóstico após visita à profissionais de saúde (MORADI et al., 2014). Um estudo de coorte retrospectivo feito

com 200 mulheres com endometriose observou que o período médio decorrido desde o início dos sintomas até o diagnóstico de endometriose foi de 7 anos (variação de $3,5 \pm 12,1$). E quanto mais jovens essas mulheres no início dos sintomas, maior foi o tempo de diagnóstico resultando em um atraso médio de 12,1 anos (variação de $8,0 \pm 17,2$) (ARRUDA et al., 2003). Outro estudo corrobora com estes achados. Um estudo retrospectivo do tipo caso-controle, envolvendo 161 mulheres brasileiras com endometriose (casos) e 179 controles observou que o tempo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico definitivo da doença foi de $5,2 \pm 6,9$ anos com idade média de $31,5 \pm 7,5$ (CARDOSO et al 2017).

A endometriose não pode ser diagnosticada apenas por sintomas. Diversos achados nos exames físicos, de imagem e laboratoriais já podem predizer que a paciente apresenta a doença. Contudo, para um diagnóstico definitivo é necessária intervenção cirúrgica, preferencialmente por videolaparoscopia, seguida de confirmação histológica (NACUL; SPRITZER, 2010). Portanto, por ser uma doença de diagnóstico predominantemente cirúrgico, muitas vezes é identificada em cirurgias não específicas para o seu diagnóstico ou tratamento (VIGANO et al., 2004).

O primeiro exame de imagem a ser solicitado na paciente com história e exame físico sugestivo de endometriose é a ultrassonografia pélvica transvaginal, preferencialmente com preparo intestinal. Um estudo com 104 pacientes com suspeita de endometriose, avaliou a acurácia deste exame para diagnosticar a presença de sítios de endometriose retosigmóide e retrocervical e observou que esse exame apresentou uma sensibilidade de 98% e 95% e uma especificidade de 100% e 98% respectivamente (ABRAO et al., 2007).

Outros procedimentos diagnósticos em casos especiais podem ser usados como técnicas especiais de imagem - tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM). A RM é cada vez mais importante na avaliação de pacientes com endometriose, pois sua capacidade de multiplanar e de contraste superior dos tecidos moles são particularmente úteis na detecção de implantes de endometriose profunda. Com seu custo elevado, perde para o ultrassom em termos de aplicabilidade no cotidiano (HOTTAT et al., 2009). Sua sensibilidade é 73-96,3% e especificidade é 70-100%) sozinha ou adicionada ao ultra-som transvaginal, além de permitir um mapeamento preciso implantes de endometriose profunda (BIANEK-BODZAK et al., 2013).

Alguns estudos identificaram que a quantificação sérica do marcador antígeno

de câncer 125 (CA-125), é um exame complementar ao diagnóstico da endometriose, porém não é específico para esta doença (ABRAO et al., 2000; RUAN; LIANG; HUANG, 2015). Sendo assim, muitas pesquisas estão sendo realizadas para identificar biomarcadores que permitam um diagnóstico preciso e não invasivo (BEDAIWY et al., 2002; KHAN et al., 2002; LUISI et al., 2015).

Apesar da boa acurácia dos métodos disponíveis no diagnóstico da endometriose, a videolaparoscopia, seguido da confirmação histológica, é o padrão ouro de diagnóstico, com visualização direta dos implantes. É um procedimento cirúrgico que permite ao médico identificar os órgãos pélvicos e localizar os focos de endometriose. A confirmação histopatológica da doença segue os critérios da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (American Society for Reproductive Medicine - ASRM) e da Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (European Society of Human Reproduction and Embryology – ESHRE (ASRM, 1997; KENNEDY et al et al., 2005). Ela se dá pela presença de glândula envolta ou não por estroma (Figura 3) muito semelhante com endométrio eutópico (MACHADO et al., 2008).

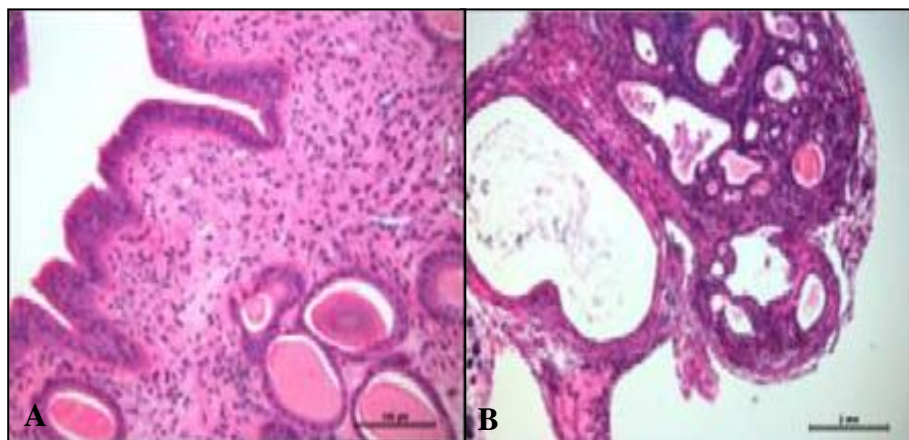


Figura 3 Histologia do endométrio. Endométrio eutópico (A) e endometriose peritoneal (B).

Fonte: KIM et al., 2014

2.2.4 Angiogênese e inflamação

A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de um pré-existente (CHUNG et al., 2010) e envolve alguns eventos que incluem quebra de membrana basal e degradação da matriz extracelular (MEC), migração e proliferação de células endoteliais, fusão com o vaso original formando uma linha contínua de células endoteliais, tubulização e início do fluxo sanguíneo por esse novo

vaso (KLAGSBRUN; D'AMORE, 1991; RAKHILA et al., 2016; LASCHKE et al; 2018) (Figura 4).

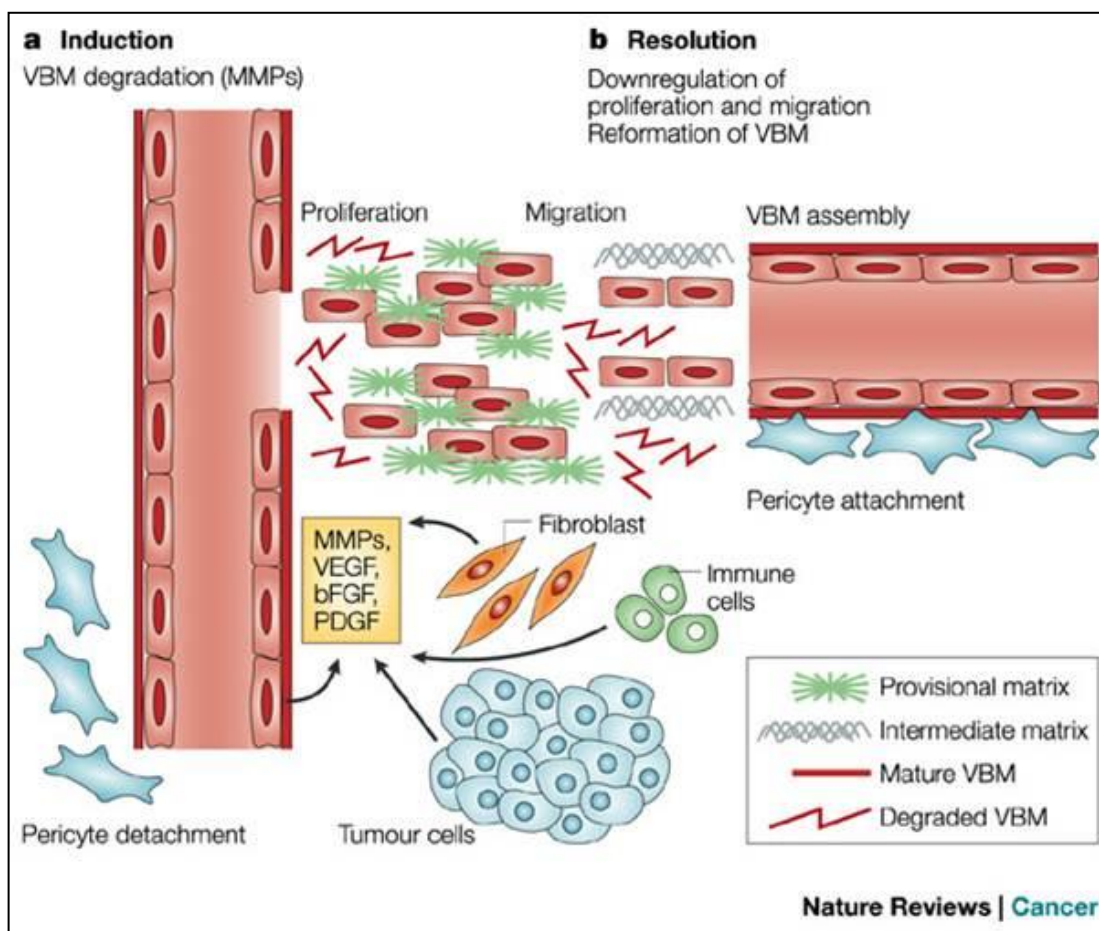


Figura 4 Angiogênese. (A) Quebra da membrana basal vascular (VBM) por estímulo das MMPs; (B) Migração proliferação e das células endoteliais por estímulo do VEGF; Novo vaso formado, amadurecido e funcional por estímulo de pericitos presentes no local.

Fonte: KALLURI, 2003

Apesar de benigna, a endometriose pode apresentar comportamento de um tumor em desenvolvimento pela capacidade de invadir, danificar e se conectar a outros tecidos (MACHADO et al., 2014), visto que a regulação da angiogênese na endometriose compartilha muitas semelhanças aos mecanismos relacionados a angiogênese patológica de tumores e metástases (LASCHKE et al., 2018).

A formação de novos vasos sanguíneos é um evento fisiológico sendo fortemente regulado em adultos, em casos como cicatrização de feridas, músculo cardíaco e no ciclo menstrual da mulher. Entretanto, a angiogênese pode ocorrer nos

processos de reparo e em algumas patologias, tais como, artrite reumatóide, retinopatia diabética, psoríase, endometriose (FOLKMAN et al., 2007; LASCHKE; MENGER, 2012), e o exemplo mais clássico relaciona-se a processos tumorais (FOLKMAN et al., 2007; HANAHAN; FOLKMAN, 1996; YADAV et al., 2015; WANG et al., 2017). Macroscopicamente, as lesões endometrióticas apresentam alta vascularização ao seu redor (Figura 5), demonstrando a importância do processo de angiogênese (GROOTHUIS et al., 2005; INES BARANAO, 2014; NAP et al., 2004; OOSTERLYNCK et al., 1992). Em 2008, nosso grupo verificou um aumento significativo da distribuição do fator de von Willebrand, um marcador de densidade vascular, em amostras humanas de endometriose de ovário, bexiga e retal quando comparadas aos respectivos tecidos normais (MACHADO et al., 2008).

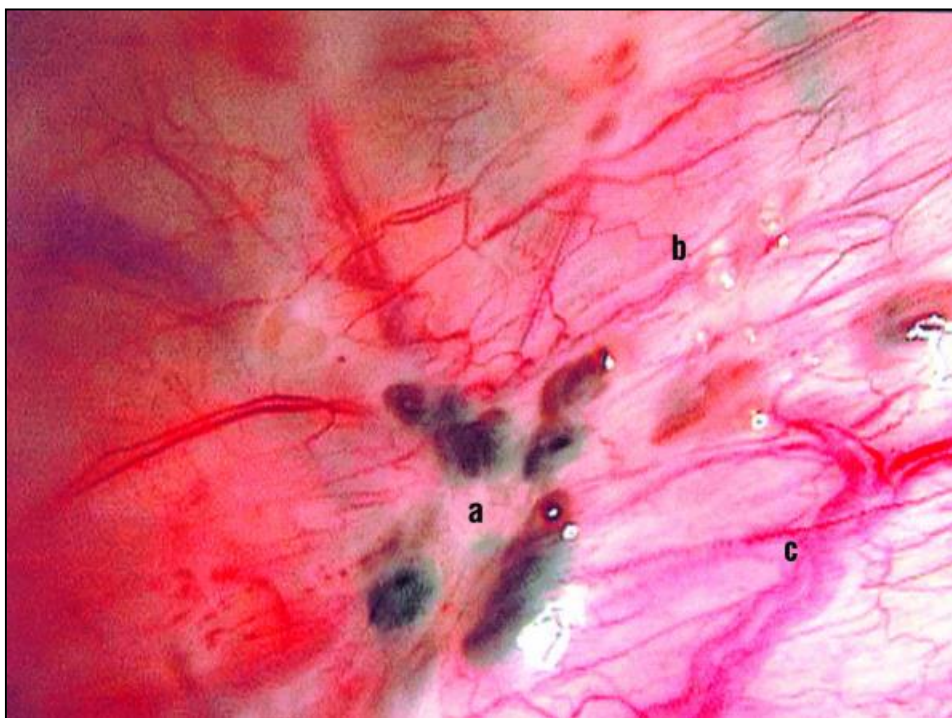


Figura 5 Visão macroscópica de focos endometrióticos no peritônio. O tecido endometrial implantado no peritônio tem uma aparência variada: lesões azul-pretas (a), placas brancas e vesículas transparentes (b) e vasos sanguíneos recém-formados (c) Fonte: PRENTICE, 2001

O processo da angiogênese é dependente de fatores liberados pelas células e para que se inicie seu mecanismo, a membrana basal e elementos da MEC precisam ser degradados. As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de enzimas que fazem essa degradação favorecendo a migração e a formação de tubos pelas células endoteliais (FREITAS et al., 1999; JANA et al., 2016). Os tipos mais encontrados na

endometriose são as MMPs 1, 2, 3, 7 e 9, porém em sua maioria, diversos estudos demonstram, *in vitro* e *in vivo*, o aumento da liberação de MMP-9 pelo endométrio tópico de mulheres com endometriose quando comparado ao endométrio normal, sugerindo assim, uma possível mudança na expressão desta MMP, sendo confirmado pelo fato de que o endométrio de mulheres com endometriose aparentemente é mais invasivo no implante endometrial (COLLETTE et al., 2004, 2006; LIU et al., 2015). O principal fator que estimula a angiogênese é o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), uma glicoproteína que apresenta várias funções biológicas como proliferação, migração, sobrevivência e permeabilidade das células endoteliais por sua ligação com seu receptor (VEGFR-2) (FERRARA et al., 2001; OKADA et al., 2014). Ele é produzido principalmente por células endoteliais, mas já foi encontrado em outras células. McLaren *et al.*, (1996) descreveram que mulheres com endometriose possuem quantidades elevadas de VEGF no líquido peritoneal e que o VEGF é produzido e secretado no líquido peritoneal, principalmente por macrófagos ali presentes, tendo sua produção aumentada quando estes estão ativados. Sugerindo que esses elevados níveis de VEGF em mulheres com endometriose podem ser importantes na patogênese da doença (MCLAREN et al., 1996). O estudo de Bourlev et al (2006a), corrobora com este achado em que foi observado um aumento de VEGF no fluido peritoneal de mulheres com endometriose sugerindo haver uma desregulação da atividade angiogênica no endométrio eutópico dessas mulheres, acompanhada de lesões endometrióticas com alta atividade proliferativa (BOURLEV et al., 2006).

Em estudo com mulheres com endometriose feito pelo nosso grupo, foi analisado por imunohistoquímica a densidade vascular e a distribuição do VEGF e seu receptor Flk-1 em endométrio tópico e em três locais de endometriose: ovário, bexiga e reto-sigmóide, identificando uma maior quantidade de vasos sanguíneos e maior imunomarcagem para VEGF e Flk-1 nas lesões de endometriose sendo mais acentuada na de reto-sigmóide. Assim, pode-se concluir que a angiogênese é encontrada principalmente em casos de doença infiltrativa (MACHADO et al., 2008).

Outro aspecto de grande importância é a elevada presença de citocinas e quimiocinas nos locais da lesão e ainda uma elevada quantidade de macrófagos no fluido peritoneal de mulheres com endometriose, caracterizando o perfil inflamatório da doença (BERTSCHI et al., 2013). Estudos demonstraram o aumento significativo de quimiocinas como ENA-78 e RANTES, bem como citocinas inflamatórias, como TNF-alfa e IL-6, em lesões de endometriose em comparação com endométrio eutópico. As

quimiocinas secretadas pelas lesões ectópicas estimulam a infiltração de macrófagos, contribuindo para o desenvolvimento da endometriose e evidencia a função primária de TNF-alfa como precursor da cascata de outras citocinas que podem estimular uma resposta pró-inflamatória (BERTSCHI et al., 2013). Recentemente, um estudo avaliou a associação de precursores da Interleucina-1 β (IL-1 β) com a inflamação peritoneal e encontrou níveis superiores em mulheres com endometriose em relação a pacientes controles. Além disso, foram observadas uma maior estimulação de secreção de macrófagos e citocinas nas mulheres com endometriose (SIKORA; MIELCZAREK-PALACZ; KONDERA-ANASZ, 2016).

A COX-2 possui grande relevância na fisiopatologia das lesões endometrióticas (KILICO et al., 2014). Esta enzima, também conhecida como prostaglandina-endoperóxido sintase 2 (PTGS2), é responsável pela biossíntese de prostaglandina a partir do ácido aracônico (CAVALCANTI et al., 2016). Além disso, a COX-2, pelo aumento dos níveis do seu produto, prostaglandina E2 (PGE-2), contribui para um aumento dos níveis de VEGF, e conseqüentemente para a progressão e manutenção das lesões endometrióticas (KILICO et al., 2014). Um estudo realizado com 136 biópsias de endometriose investigou a distribuição de COX-2 por imunohistoquímica e foi observada forte marcação de COX-2 em cistos de endometriose ovariana, implantes peritoneais e nódulos reto-vaginais (FAGOTTI et al., 2004). Uma correlação entre a expressão da COX-2 e a intensidade da dismenorrea grave relacionada a endometriose foi avaliada em estudo de 46 mulheres com endometriose profunda e 34 mulheres saudáveis submetidas a cirurgia para retirada de amostra para biópsia. Foram realizadas avaliação da dor para dismenorréia (utilizando uma escala analógica linear de 10 pontos) e imunohistoquímica para marcação de COX-2, resultando em uma expressão significativamente elevada de COX-2 em células estromais de endométrio eutópico de mulheres com dismenorrea mais grave (MATSUZAKI et al., 2004). O aumento da expressão e da distribuição de COX-2 também foi verificado por imunohistoquímica e PCR em 28 biópsias de endometriose ovariana em comparação com o endométrio eutópico e peritônio normal (CHISHIMA et al., 2002). Os níveis plasmáticos de PGE2, avaliados por ELISA, também estão aumentados em pacientes com endometriose comparadas com mulheres saudáveis, podendo ser um fator importante na invasão de células endometrióticas e conseqüentemente no desenvolvimento e sobrevivência da endometriose (TAKENAKA et al., 2010).

Considerando a importância dos fatores angiogênicos na progressão da endometriose e na promoção da inflamação, bem como o custo e a invasividade do diagnóstico/tratamento cirúrgico, assim como a falta de um arsenal medicamentoso no tratamento dessa patologia ginecológica, ganha-se relevância encontrar uma terapia com o objetivo de reduzir o processo angiogênico e inflamatório envolvido na endometriose.

2.2.5 Tratamento da endometriose

O tratamento cirúrgico da endometriose compreende desde procedimentos de baixa complexidade, como cauterização de focos superficiais e liberação de aderências velamentosas, até intervenções complexas nos ovários, intestino, bexiga e ureteres. Contudo, a videolaparoscopia assume um papel relevante no controle da endometriose, pois permite ao ginecologista identificar e remover todos os focos da doença durante o ato cirúrgico (KHO; ABRAO, 2012). Atualmente, sabe-se que não há correlação entre a gravidade dos sintomas e a extensão da doença, bem como com o prognóstico reprodutivo de infertilidade e de recorrência de dor em longo prazo (VERCELLINI et al., 2007; YE et al., 2015). As estimativas de reincidência da endometriose são altas após cirurgia de remoção dos focos. Em um estudo retrospectivo de série de casos realizado por Koga et al. (2006), foi observado um risco de recorrência global de 30,4%, após a remoção completa de todas as lesões endometrióticas visíveis, corroborando com os achados de estudos anteriores (ABBOTT et al., 2003; BUSACCA, 1999; KOGA, 2006). Em 2009, foi observado que após o tratamento cirúrgico houve regressão de 70 a 80% nos sintomas da endometriose, porém a recorrência de reoperação variou entre 20 a 25% (VERCELLINI et al., 2009a). Assim, muitas vezes se preconiza o tratamento cirúrgico apenas para pacientes que não respondam ao tratamento medicamentoso, bem como para aquelas que desejam engravidar espontaneamente (KOGA, 2006; VERCELLINI et al., 2009b).

Como o arsenal medicamentoso existente não dispõe de nenhum fármaco capaz de erradicar por completo os focos ectópicos de tecido endometrial que caracterizam a doença, o alívio dos sintomas acaba sendo o principal objetivo do tratamento da endometriose (ABRAO, 2000; SEO et al., 2010). Essa abordagem terapêutica varia, dependendo da queixa da paciente, e os tratamentos mais difundidos atualmente são a cirurgia, a terapia de supressão ovariana ou a associação de ambos (KENNEDY et al., 2005).

O tratamento clínico hormonal visa inibir a produção de gonadotrofinas (GnRH), anulando a esteroidogênese e, subsequentemente, liquefazer, necrosar e absorver os implantes. O tratamento pode ser realizado com a administração contínua de anticoncepcionais orais (ACO), progestagênio sintético ou análogos de GnRH (KENNEDY et al., 2005; ZITO et al. 2014). Em resumo esses agentes criam um ambiente hipoestrogênico (agonistas de GnRH), hiperandrogênico (danazol) ou hiperprogestogênico (contraceptivos orais, progestágenos), com supressão da proliferação de células endometriais (VERCELLINI et al., 2014). Alguns estudos demonstraram que esses tratamentos são igualmente efetivos, porém se diferem nos efeitos adversos e custo (DAVIS et al., 2007; SELAK et al., 2007). Um estudo de revisão relatou que as estimativas de custos farmacológicos são menores que os custos com a cirurgia, porém, os gastos no tratamento clínico foram altos, variando de \$ 184 a \$ 1888 na Áustria e EUA (SOLIMAN et al., 2016).

Os anticoncepcionais combinados (ACs) são considerados primeira linha no tratamento da dor associada à endometriose peritoneal. São simples de serem administrados, possuem eficácia durante seu período de uso e uma supressão atenuante da dismenorreia, além de boa tolerabilidade. Isso ocorre porque agem na inibição da ovulação, reduzindo a proliferação endometrial, limitando a produção de prostaglandinas (NACUL; SPRITZER, 2010). Níveis de hormônios plasmáticos indicam que o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) estão suprimidos. O surto de LH encontra-se ausente na metade do ciclo, os níveis de esteróides endógenos se mostram diminuídos e que a ovulação não ocorre (GOODMAN; GILMAN, 2012). Podem ser administrados de forma cíclica ou contínua dependendo da dor associada com o sangramento mensal. Os ACs contendo progestogênios mais androgênicos (derivados da 19-nortestosterona) são tradicionalmente prescritos para a endometriose, porém os derivados da 17- α -hidroxiprogesterona também têm se mostrado efetivos (NACUL; SPRITZER, 2010). Um estudo com 47 mulheres divididas em dois grupos, utilizaram ACs (noretisterona 1mg + etinilestradiol 35 mg via oral e leuprolide 11,25mg injetável + acetato de noretindrona 5mg VO) por 48 semanas e verificaram uma diminuição da dor pélvica, dismenorreia e dispareunia (GUZICK et al., 2011). A maioria dos efeitos adversos dos anticoncepcionais é dependente da dose e incluem efeitos cardiovasculares, como hipertensão, infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico hemorrágico ou isquêmico, trombose venosa e embolismo, cânceres de mama, hepatocelulares e

cervicais, além de efeitos endócrinos e metabólicos levando a um consenso de que mulheres sem fatores de risco predisponentes acarretam riscos mínimos as preparações de baixas doses (GOODMAN; GILMAN, 2012; GUZICK et al., 2011)

Os progestogênios isolados representam a próxima linha de tratamento para os pacientes com dor associada à endometriose. Uma grande variedade de medicamentos orais, parenterais, e progestágenos implantáveis têm sido utilizados nesta finalidade. Estes inibem o crescimento do endométrio induzindo a decidualização, seguida da atrofia dos implantes endometrióticos (BEDAIWY et al., 2017). Podem ser utilizados pela via intramuscular, subcutânea, subdérmica e intrauterina além da via oral. Como progestogênios são encontrados o acetato de noretisterona, acetato de ciproterona, levonorgestrel – dispositivo intrauterino que assegura a contracepção e é eficaz por até cinco anos - dienogest (não disponível no Brasil) e o acetato de medroxiprogesterona na forma de depósito (DMPA) esse último, administrado a cada três meses e que apresentam melhora na dor assim como os análogos de GnRH e com perda mineral óssea menos significativa (NACUL; SPRITZER, 2010). Pequenos sangramentos irregulares ou de escape constituem o principal efeito adverso desse tratamento que com o tempo diminui. Contudo também é relatada a presença de outros efeitos como acne, depressão, dor de cabeça, manchas, ganho de peso e desconforto da mama (BEDAIWY et al., 2017; GOODMAN; GILMAN, 2012; NACUL; SPRITZER, 2010). Um estudo europeu avaliou em quatro ensaios randomizados os efeitos do tratamento com dienogest (2 mg ao dia) em 332 mulheres com endometriose durante períodos de estudos entre 12 e 65 semanas; como resultado, apesar de um perfil de segurança favorável, com diminuição no quadro de dismenorreia e dispareunia, as pacientes relataram alguns efeitos adversos como dor de cabeça, desconforto nas mamas, acne, depressão e até hemorragia (STROWITZKI et al., 2015).

Os análogos de GnRH são indicados no tratamento da endometriose quando há falha no tratamento com contraceptivos orais. Podem ser administrados pela via nasal (spray) ou injeção subcutânea (diária, mensal ou trimestral). O tratamento prolongado com análogos de GnRH leva a regulação negativa do seu receptor na hipófise com subsequente diminuição da secreção pituitária de LH e FSH suprimindo o crescimento folicular ovariano e a ovulação, resultando em níveis baixos de estradiol e progesterona circulantes (“pseudo-menopausa”) (BEDAIWY et al., 2017; SCHRAGER; FALLERONI; EDGOOSE, 2013). Dentre os análogos de GnRH estão a leuprolida formulada em várias doses para injeção subcutânea (500 mg/dia), subcutânea de

depósito (7,5 mg/mês; 22,5 mg/3 meses; 30 mg/4 meses; 45 mg/6 meses) e intramuscular de depósito (3,75 mg/mês; 11,25 mg/3 meses), goserrelina formulada como implante subcutâneo (3,6 mg/mês; 10,8 mg/12 meses) e nafarelina como spray nasal (400 ug/dia). Como efeito adverso os agonistas de GnRH incluem ondas de calor, diminuição da densidade óssea, ressecamento e atrofia da vagina, assim a terapia limita-se em geral a seis meses (GOODMAN; GILMAN, 2012; MCLAREN; MORRIS; RYMER, 2012). Muitas das vezes o uso de GnRH associado à estrogênio e progestogênio (terapia de add back) reduz a severidade dos sintomas relacionados com a perda mineral óssea (SURREY et al., 2002). Um estudo comparou a eficácia e segurança do DMPA (104 mg IM) com um análogo de GnRH (acetato de leuprolide – 11,25 mg IM) no tratamento de 274 mulheres com diagnóstico cirúrgico de endometriose, durante 6 meses, e como efeitos adversos foram observados nas pacientes que administraram o análogo de GnRH reações como dor em algum membro, secura vulvovaginal e afrontamentos (SCHLAFF et al., 2006).

Andrógenos sintéticos como o danazol, um derivado da 17 α -etinil-testosterona, tem forte atividade anti-estrogênica, induz a inibição da liberação de gonadotrofina, determina a inibição competitiva das enzimas esteroideogênicas, modula a função imunológica e reduz a proliferação celular e os sintomas de dor associados à endometriose (TOSTI et al., 2017). Soares et al, 2012 reuniu estudos de tratamento com danazol em mulheres com endometriose quando comparados com análogos de GnRH e o danazol obteve maior eficácia na redução da dor causada pelos focos de endometriose. Porém, houve o aparecimento de alguns efeitos adversos, como aumento do ganho de peso, atrofia vaginal, acne, seborreia, cabelos oleosos, dor de cabeça, alteração na função hepática e no colesterol, concluindo que o danazol faz parte da 3^a linha de tratamento, não sendo o tratamento mais indicado (SOARES et al., 2012).

Há ainda o tratamento com inibidores da aromatase, porém muita das vezes associado com análogos de GnRH para melhora dos sintomas dolorosos no pós operatório de pacientes com endometriose (NACUL; SPRITZER, 2010). SOYSAL et al, 2004 mostrou em um estudo randomizado que mulheres que faziam tratamento associando inibidores da aromatase com análogos de GnRH tiveram maior eficácia no combate aos sintomas dolorosos do que aquelas que utilizaram apenas GnRH no seu tratamento. Como efeitos adversos proveniente desse tratamento estão enjoo, inchaço, aumento de peso, sangramento vaginal, tontura e aumento da transpiração o que dificulta a continuação do tratamento (SOYSAL et al., 2004).

Diversos estudos avaliam o tratamento da endometriose com inibidores seletivos da COX-2, uma classe especial de medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) que foram desenvolvidos para tratar a dor e inflamação sem provocar danos no sistema gastrointestinal (KILICO et al., 2014). Nosso grupo verificou o efeito terapêutico do parecoxibe, um inibidor seletivo de COX-2, em modelo experimental de endometriose peritoneal. Além de reduzir significativamente o tamanho das lesões de endometriose o AINE também atuou na via de antiangiogênese devido a diminuição da expressão de VEGF e seu receptor Flk-1 (MACHADO et al., 2010a). Outro estudo de endometriose induzida cirurgicamente em ratas testou outro inibidor de COX-2, o celecoxibe, durante 28 dias e observaram uma redução significativa no número de lesões estabelecidas, no tamanho e na área vascularizada (OLIVARES et al., 2013). No entanto, estudos clínicos prospectivos e de meta-análises descrevem que inibidores seletivos da COX-2 apresentam efeitos adversos graves, aumentando o risco de infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, renal, hipertensão arterial e acidente vascular cerebral (BATLOUNI, 2010; CARVALHO; CARVALHO; RIOS-SANTOS, 2004).

As alternativas disponíveis para o tratamento da endometriose oneram consideravelmente o sistema de saúde, podendo alcançar cerca de 22 bilhões de dólares, considerando uma prevalência de 10%. A maior parte deste custo é relativa às cirurgias, que são mais caras que o tratamento medicamentoso (SPIGOLON; MORO, 2012). Assim, é de grande relevância social, clínica e econômica o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para a endometriose.

2.2.6 *Euterpe oleracea*: Efeito farmacológico

A *E. oleracea* Mart. (Arecaceae), popularmente conhecido como "açai" (Figura 6) é uma planta economicamente importante que se encontra amplamente na região amazônica do Brasil, originária da América Central e do Sul. É usada tradicionalmente, como planta medicinal e alimento básico em muitas partes do Brasil e ganhou nos últimos anos atenção internacional como alimento funcional devido aos seus benefícios nutricionais e promessa terapêutica (DE MOURA; RESENDE, 2016; KINGHORN et al., 2011; LICHTENTHALER et al., 2005; SCHAUSS et al., 2006a; ULBRICHT et al., 2012; YAMAGUCHI et al., 2015).

A polpa do açai é composta de cerca de 48% de lipídios, 13% de proteína, 8% de aminoácidos, 25% de açúcares totais e quantidades menores de compostos como: fibras, vitaminas (A, B1, B2, B3, C e E) e diversos outros fitoquímicos, como as lignanas, os

polifenóis (antocianinas, proantocianidinas e outros flavonóides), os esteróides e o resveratrol (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011; SCHAUSS et al., 2006b; ULBRICHT et al., 2012).

Os principais compostos fitoquímicos encontrados no açaí são:

- Antocianinas: 3-glucosido de cianidina, cianidina 3-rutinosido, cianidina 3-glucosido, cianidina 3-sambubiosideo, peonidina 3-glicosídeo, pelargonidina-3-glucosideo - (DEL POZO-INSFRAN; BRENES; TALCOTT, 2004; HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011; JENSEN et al., 2008; SCHAUSS et al., 2006b; ULBRICHT et al., 2012).
- Proantocianidinas - epicatequina, catequinas e procianidinas tipo b (ULBRICHT et al., 2012).
- Flavonóides - homoorietina, orientina, scoparina, e isovitexina (DEL POZO-INSFRAN; BRENES; TALCOTT, 2004; HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011; SCHAUSS et al., 2006b; ULBRICHT et al., 2012).

Além disso, a planta é composta de ácidos graxos como o ácido oléico, ácido linoléico e ácido palmítico (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011; SCHAUSS et al., 2006b; ULBRICHT et al., 2012) e lignanas - isolariciresinol; 5-metóxi-isolariciresinol (CHIN et al., 2008; HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011).



Figura 6 Fruta açaí (*E. oleracea*) amplamente encontrado na Região Amazônica.
Fonte: www.portalamazonia.com.br

Suas propriedades farmacológicas gerais estão relacionadas com a sua atividade antiproliferativa, anti-inflamatória e antioxidante e efeitos cardioprotetores (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011; SILVA et al., 2014). A atividade antioxidante atribuída ao açaí está associada aos seus componentes polifenóis, como por exemplo, as antocianinas e os flavonóides (DEL POZO-INSFRAN; BRENES; TALCOTT, 2004; JENSEN et al., 2008; KANG et al., 2010; ULBRICHT et al., 2012, NERI-NUMA et al 2018). Schauss *et al.*, 2006 analisaram a capacidade antioxidante da polpa de açaí por diferentes ensaios *in vitro* com várias fontes de radicais livres e observaram que o açaí exibiu uma atividade excepcional contra o superóxido no ensaio de eliminação de superóxido (SOD) (SCHAUSS et al., 2006a).

Uma pesquisa realizada com açaí e células microgliais de ratos observou uma diminuição significativa na produção de nitrito, acompanhada por uma redução na expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (MATHEUS et al 2006). O efeito antioxidante e anti-inflamatório do açaí também foi descrito por um de nossos colaboradores ao observar uma diminuição da inflamação pulmonar, das taxas de macrófagos alveolares, neutrófilos, mieloperoxidase, superóxido dismutase e catalase em camundongos expostos à inalação crônica de fumaça de cigarro (DE MOURA et al., 2011; MOURA et al., 2012).

Um estudo *in vitro* com células microgliais de murino tratados com frações da polpa de açaí, observou uma redução da expressão de COX-2 induzida por lipopolissacarídeo (LPS) analisadas por Western Blot (POULOSE et al., 2012). Outro estudo com células CCD-18Co de miofibroblasto de cólon não cancerosas que foram mantidas em meio de cultura também avaliaram o efeito do açaí na redução de COX-2 estimulada por LPS e avaliadas por Western Blot, sugerindo que o açaí pode atuar como um possível anti-inflamatório (DIAS et al., 2015). O açaí também foi estudado em um modelo animal de dor aguda e neuropática, sendo observada uma redução significativa das respostas nociceptivas a dor inflamatória aguda, indicando que o extrato pode ser útil no desenvolvimento de um tratamento analgésico (SUDO et al., 2015).

Considerando o efeito do açaí em modelos *in vitro* para o estudo do câncer, frações polifenólicas da polpa do açaí já demonstraram reduzir a proliferação das células leucêmicas HL-60, provavelmente por apoptose devido à ativação da caspase-3 (DEL POZO-INSFRAN; PERCIVAL; TALCOTT, 2006). Em modelo experimental, *in vivo* de câncer de esôfago induzido por N-nitrosometilbenzilamina (NMBA) foi observado que a polpa do açaí reduziu a proliferação celular e o tamanho dos tumores

podendo atuar como um agente quimiopreventivo (STONER et al., 2010). Silva et al. (2014), demonstrou a ação do açaí em um estudo *in vitro* com células de carcinoma mamário humano e observou uma redução da viabilidade celular e modificação das características morfológicas das células pela presença de vacúolos autofágicos no citoplasma de células MCF-7, induzindo autofagia a partir do aumento na expressão de LC3B-II, mostrando o potencial antitumorigênico do açaí (SILVA et al., 2014). Dias et al, 2014 avaliaram a atividade de inibição do extrato polifenólico de açaí no crescimento de células de câncer de cólon (HT-29 e SW-480) e de fibroblastos de cólon não malignas (CCD-18Co) e observaram que o açaí inibiu o crescimento dessas células de forma significativa além de inibir a expressão de VEGF (DIAS et al., 2014).

Um possível efeito hipocolesterolêmico foi analisado em um estudo com animais que foram alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica suplementada com polpa de açaí a 2% causando a diminuição significativa no colesterol total sérico, colesterol de lipoproteína de baixa densidade e índice aterogênico (DE SOUZA et al., 2012). Um estudo investigou o efeito do extrato de semente do açaí (300 mg/kg ao dia) rico em polifenóis na adiposidade e esteatose hepática em camundongos que se alimentavam com dieta rica em gordura durante 12 semanas, sendo avaliados o perfil lipídico, a glicose, o ganho de peso corporal e colesterol. Como resultado, açaí reduziu o ganho de peso, níveis de glicose e colesterol no fígado que foi associado a uma redução da esteatose hepática (DE OLIVEIRA et al., 2015).

2.2.7 *Euterpe oleracea*: Toxicologia

A avaliação toxicológica de uma substância tem como objetivo identificar possíveis efeitos nocivos que essa possa desencadear nos seres vivos devido a uma exposição pelas diferentes vias. Com isso, os modelos animais são os mais utilizados nos estudos de toxicidade e nos processos investigativos. Estes testes toxicológicos são complementares aos testes biológicos, sendo necessários para a liberação das substâncias em humanos (BEDNARCZUK et al., 2010; CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).

Ribeiro et al, 2010 investigou, *in vivo*, a genotoxicidade do açaí após administração da doxorrubicina (16 mg/kg), um quimioterápico altamente tóxico e que induz danos ao DNA. Foram administradas doses de açaí (3,3, 10 e 16,67 g/kg), via gavagem, sozinho ou após injeção intraperitoneal de doxorrubicina. Em seguida, não

foram observados efeitos genotóxicos do açaí nas três doses, após avaliar a presença de micronúcleos na medula óssea e eritrócitos policromáticos de células de sangue periférico, e danos no DNA nas células de sangue periférico, fígado e rim pelo método de ensaio cometa. Além disso, o açaí apresentou um efeito protetor aos danos no DNA, após administração conjunta com a doxorubicina, comparados aos controles (RIBEIRO et al., 2010). Foi estudada também, a segurança de um suco de fruta enriquecido com açaí (*E. oleracea Mart*) e observou-se que a bebida não apresentou efeitos mutagênicos, clastogênicos, citotóxicos ou genotóxicos pelos ensaios de mutação reversa bacteriana, ensaio de aberração cromossômica, ensaio de micronúcleo e mutação genética em nenhuma das doses testadas tanto em estudo de toxicidade oral aguda (5000 e 20000 mg/kg) quanto em estudo de toxicidade subcrônica oral (10, 20 e 40 g/kg) nos grupos tratados quando comparados ao controle (SCHAUSS et al 2010). Outro estudo avaliou o potencial genotóxico do óleo do fruto de *E. oleracea*, *in vivo*, em ratos Wistar que foram divididos em cinco grupos: um controle negativo com solução salina via gavagem; injeção intraperitoneal de doxorubicina (16 mg/kg) como controle positivo e três doses diferentes de açaí via gavagem (30, 100 e 300 mg/kg) durante 14 dias. Foi realizado o ensaio cometa para avaliar o dano do DNA nos leucócitos, fígado, medula óssea e células testiculares; os possíveis efeitos clastogênicos e aneugênicos nas células da medula óssea foram avaliados pelo teste do micronúcleo. Ambos os testes citogenéticos realizados mostraram que *E. oleracea* não apresentou efeitos genotóxicos significativos nas células analisadas, nas três doses testadas (MARQUES et al., 2016). Até o presente momento, não existem dados sobre o efeito farmacológico e toxicológico do extrato de açaí no tratamento da endometriose.

3. JUSTIFICATIVA

A endometriose é uma doença ginecológica de elevada frequência, acometendo cerca de 5-10% das mulheres em idade reprodutiva, podendo apresentar sintomas como dismenorreia, dor pélvica crônica, sintomas intestinais e urinários, além de causar perda da qualidade de vida e incapacidade reprodutiva.

As alternativas disponíveis para o tratamento da endometriose oneram consideravelmente o sistema de saúde, sendo a maior parte do custo relativa às cirurgias. O tratamento clínico da endometriose é baseado em hormônio-terapia, aliviando os sintomas, contudo apresenta efeitos adversos. Assim, é de grande relevância social, clínica e econômica o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para a endometriose.

Considerando que o extrato de açaí apresenta efeitos benéficos à saúde, além da atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena, podemos considerar que o açaí é um promissor agente terapêutico, de baixo custo, que pode ser testado como um possível tratamento farmacológico para endometriose. Além disso, visto que a endometriose apesar de benigna apresenta características de um tumor em desenvolvimento, é importante avaliar os estudos de modelos experimentais de câncer tratados com açaí, bem como seus possíveis efeitos toxicológicos, a fim de estudar vias de sinalização moduladas pelo açaí na endometriose.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Avaliar o efeito farmacológico do extrato de *E. oleracea* em modelo experimental de endometriose, e descrever os dados de segurança/toxicidade e anticancerígeno da utilização do açai em modelos pré-clínicos saudáveis.

4.2. Específicos

4.2.1. Avaliar o efeito do extrato de açai nos processos angiogênicos (VEGF, VEGFR2, MMP-9), inflamatórios (COX-2, PGE-2, F4-80) e oxidantes (NO) da endometriose experimental.

4.2.2. Realizar uma revisão sistemática de informações disponíveis na literatura científica dos dados da segurança da utilização do extrato de açai em modelos pré-clínicos saudáveis e em modelos experimentais de câncer que utilizaram roedores.

5. METODOLOGIA

Visando atingir os objetivos específicos foram realizadas duas metodologias distintas. Assim, os objetivos específicos 4.2.1. foi alcançado realizando um estudo experimental *in vivo* para avaliar o tratamento do açaí na endometriose, ao passo que para responder ao objetivo específico 4.2.2. foi realizada uma revisão sistemática da literatura.

5.1 MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSE

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), protocolo CEUA-UEZO-009/2014 (Anexo 1), e todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes éticas da CEUA e das Diretrizes de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>. Edição; 2011).

Vinte ratas Wistar (250-300 g) foram separadas após completar oito semanas de idade sendo alojados em gaiolas de polietileno no Biotério da UEZO, mantidas a uma temperatura constante (25°C), sob um ciclo de claro/escuro de 12 horas com livre acesso a comida e água. A endometriose foi induzida de acordo com o método descrito por Vernon e Wilson em 1985. Os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de 0,1ml de Xilazina 2% e 0,2 ml de Ketamina, em seguida, foi realizada uma incisão de 3 cm na linha central no abdômen para expor o útero, um corno uterino foi removido e o segmento colocado em solução salina tamponada com fosfato a 37°C, sendo dividido longitudinalmente, seccionado e implantado peças de 5x5 mm, com o lado do endométrio voltado para parede abdominal e suturados com fio de nylon (6-0 Prolene, Ethicon, Piscataway, NJ). Após o procedimento cirúrgico, o abdômen foi fechado e os animais foram alocados para recuperação (VERNON; WILSON, 1985).

O tempo para estabelecimento das lesões de endometriose foi de 15 dias, já descrito pelo nosso grupo de estudo como sendo o ideal para a implantação das lesões na parede abdominal (MACHADO et al., 2010b). Após as duas semanas de estabelecimento, os animais foram anestesiados novamente, as lesões foram identificadas após abertura do abdômen para análise macroscópica com fotografia e medição de comprimento, largura e profundidade do implante com régua e também

utilizando o programa ImageJ para obter a área da lesão. Posteriormente a essas análises os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos para início do tratamento.

5.1.1 Tratamento com extrato de *E. oleracea* em modelo experimental de endometriose

Foi realizado o tratamento dos animais utilizando o extrato liofilizado do fruto total de *E. oleracea*, cedido por um de nossos colaboradores obtido na Baía Amazônica (Belém, Pará, Brasil), exsicata número 29052 Museu Goeldi-Belém do Pará, e este estudo foi autorizado pelo Conselho Nacional De Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Autorização: 010564 / 2015-2).

Após estabelecimento das lesões de endometriose os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos. O grupo tratado recebeu 200 mg do extrato de *E. oleracea* por quilo do animal (n= 10), diluídos em solução salina e administrado via gavagem, diariamente, por um período de 30 dias. O grupo controle recebeu apenas solução salina (n= 10), via gavagem, também por 30 dias. No tempo determinado de 45 dias após a indução das lesões de endometriose (15 dias de indução mais 30 dias de tratamento), os animais (n= 20) foram eutanasiados para avaliação macroscópica. Após a indução da endometriose os animais foram pesados semanalmente e durante todo o tempo de indução e tratamento com *E. oleracea*. Após a eutanásia dos animais foram observados parâmetros de crescimento das lesões, como comprimento e largura. As amostras de lesões de endometriose foram coletadas para análise histológica e molecular para extração do RNA mensageiro. Foram coletados ainda amostras de sangue e de lavado peritoneal para análises hematológicas e bioquímicas, respectivamente.

5.1.2 Análise dos efeitos farmacológicos do açaí em modelo experimental de endometriose

5.1.2.1 Análise histológica e imunohistoquímica

As amostras das lesões foram coletadas, fixadas em paraformaldeído (PFA) e processadas para a histologia de acordo com o protocolo a seguir:

As lesões foram colocadas em cassetes e levadas a banhos sucessivos em álcool I, II e III por 30 minutos cada. Foram realizados banhos em xilol I, II e III durante 30 minutos e então as amostras de tecido foram colocadas na parafina I e II por 20 minutos

cada para a inclusão. Foram feitos cortes de 5µm de espessura com auxílio de um micrótomo e as lâminas foram coradas com hematoxilina por 3 minutos e eosina por 30 segundos; em seguida, os cortes foram então hidratados em 3 banhos sucessivos de álcool 70%, 80% e 100%, clarificados em xilol (I, II e III) (5 minutos/cada), e montados com entellan para serem observados por microscopia óptica. As lesões foram confirmadas pela presença de componentes endometriais estromais e/ou glandulares.

Para o estudo da angiogênese, inflamação e presença de macrófagos foi realizada imunomarcagem para identificação de VEGF, seu receptor Flk-1, MMP-9, COX-2 e F4-80 seguindo o protocolo descrito por MACHADO et al., 2014.

As lâminas foram desparafinizadas com 3 banhos de álcool por 30 minutos cada e após foram realizados 3 banhos com xilol por 30 minutos cada, seguidos de um banho com água destilada por 5 minutos. Foi realizada então a recuperação antigênica com tampão citrato 0,01M, com o pH 6,0 no micro-ondas. Após o tampão ter fervido, as lâminas foram colocadas por 5 minutos nesse tampão. As lavagens entre as várias etapas foram feitas com tampão fosfato (PBS 0,1M, pH 7,4) em temperatura ambiente em 2 banhos de 5 minutos cada. Após isso, a inativação da peroxidase endógena foi realizada com peróxido a 3% por 15 minutos em temperatura ambiente, seguida de 2 banhos com tampão fosfato (PBS 0,1M, pH 7,4), em temperatura ambiente, por 5 minutos cada. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com PBS/BSA 5% por 30 minutos em câmara úmida. Os cortes foram então incubados com anticorpo primário monoclonal anti-VEGF (SC 57496 – Santa Cruz Biotechnology) 1:100, anti-Flk-1 (SC-6251 - Santa Cruz Biotechnology) 1: 100, anti-MMP-9 (SC 6840 – Santa Cruz Biotechnology) 1:200, anti-COX-2 (SC-1747 - Santa Cruz Biotechnology) 1:100 e anti-F4-80 (SC-26642 Santa Cruz Biotechnology) 1:200 diluídos em PBS/BSA 1% em câmara escura e úmida overnight. Para o controle negativo foi utilizado apenas o PBS/BSA 1% sem o anticorpo monoclonal. Após 2 banhos com tampão fosfato em temperatura ambiente por 5 minutos cada, os cortes foram incubados com anticorpo secundário Biotina (K 0690 - DAKO) e Estreptavidina por 30 minutos cada com dois banhos com tampão fosfato em temperatura ambiente por 5 minutos cada entre os anticorpos. Os cortes foram revelados com diaminobenzidina (DAB) (K 3468 - DAKO) ficando o tempo necessário para se obter uma coloração castanha seguido de um banho de água destilada por 2 minutos e contrastados com hematoxilina por 5 minutos e, em seguida, colocados em água corrente por 2 minutos. Por fim, os cortes foram hidratados em 2 banhos de álcool 90% e 100%, clarificados em xilol I, II e III em banhos de 5 minutos cada, e montados com

lamínula e entellan para posteriormente serem observados em microscópio óptico (Nikon, Tokyo, Japão).

A observação microscópica das amostras marcadas com VEGF, FLK-1, MMP-9, COX-2 e F4-80 foi realizada utilizando um microscópio óptico (Nikon, Tokyo, Japão) e fotografadas em câmera digital. Para cada lâmina foram analisados 10 campos aleatórios de maior aumento (40X), utilizando a média dos resultados obtidos. A contagem das áreas marcadas foi analisada em programa de análise de imagem Image Pro Plus 4.0 sendo correlacionada com as áreas demarcadas (per área), expressas em porcentagem.

5.1.2.2 Ensaio da transcriptase reversa seguido da reação em cadeia da polimerase em tempo real

O RNA total obtido a partir das lesões endometrióticas foi isolado utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen™ por Life Technologies, Nova Iorque, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O tecido foi triturado e transferido para um tubo tipo eppendorf de 1,5 ml contendo 200 ul de clorofórmio e homogeneizado em homogeneizador automático. Logo em seguida, permaneceu 5 minutos no gelo e foi centrifugado a 10000 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e transferido para um outro tubo do tipo eppendorf de 1,5 ml, foi adicionado 120 ul de clorofórmio e foi centrifugado a 12000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e alocado em eppendorf 1,5 ml, foi adicionado 500 ul de isopropanol e deixado por 10 min em temperatura ambiente. Em seguida foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. O isopropanol foi vertido, sendo adicionado 500 ul de etanol 70% (diluído em água DEPC) e centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após esse procedimento, o etanol foi vertido e o eppendorf virado em cima de um papel até secar. Foram adicionados 30 ul de água DEPC (livre de RNase). A integridade do RNA foi confirmada por eletroforese, utilizando gel de agarose a 1,2%, corado com SYBR Stain® (Invitrogen™ pela Life Technologies, NY, EUA). Também foram verificadas as absorbâncias em 230, 260 e 280 nm como medida de pureza em espectrofotômetro (Nanodrop® 1000, Thermo Scientific, Wilmington, EUA). A amostra foi armazenada em freezer -80°C até a construção do DNA complementar (cDNA).

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 2000 ng de RNA utilizando o ensaio de transcriptase reversa (RT) da Invitrogen (SuperScript II reverse transcriptase), de

acordo com o protocolo do fabricante. Em resumo, foi adicionado 12 ul de água DEPC em cada tubo e no primeiro mix foi pipetado: 1 ul de oligo dT, 1 ul de dNTP e o RNA, submetidos ao termociclador a 65°C por 5 min. Em seguida, o 2º mix é adicionado (4 ul do tampão, 2 ul de DTT e 1 ul de RNase) e submete-se novamente ao termociclador a 42°C por 2 min. Após esse procedimento os tubos são alocados no gelo e é adicionado 1 ul da enzima SS2 em cada tubo e submetido ao termociclador: 42°C por 50 min e 70°C por 15 min.

As reações em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR) em tempo real foram realizadas no aparelho 7500 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando o sistema de detecção TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com ensaios de oligonucleotídeos e sondas específicos para cada gene de interesse, validadas e adquiridas da empresa Applied Biosystems. Foram quantificados os genes *VEGF* (Mm01281449_m1), receptor de domínio de inserto de quinase (KDR), gene que codifica o *VEGFR-2* (Mm01222421_m1), *MMP-9* (Mm004422991_m1) e *PTGS*, gene que codifica a enzima COX-2 (Mm00478374_m1) e como um controle endógeno o gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase (*GAPDH*) (Mm99999915_g1).

O qPCR foi realizado com 2 ul de cDNA, 5 ul de TaqMan master mix (Applied Biosystems) e 0,5 ul do ensaio de sonda e oligonucleotídeos, nas seguintes condições: 95° C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95° C durante 15 segundos, 60° C durante 1 minuto e 72° C por 30 segundos.

O Delta-Delta Ct foi utilizado para determinar a quantificação relativa da expressão dos genes estudados. Os valores foram normalizados em relação à expressão constitutiva de *GAPDH*. Duas séries de experimentos foram realizados para cada amostra de tecido para assegurar a reprodutibilidade. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

5.1.2.3 Citometria de fluxo

A coleta do lavado peritoneal foi realizada introduzindo no peritônio das ratas 10 ml de PBS e aspirando o líquido em seguida. Após a coleta, o material foi colocado em tubo falcon, sendo centrifugado por 5 minutos em uma rotação de 1200 rpm e desprezado o sobrenadante. No pellet formado foi adicionado 2 ml de PFA a 4% e mantido em geladeira.

Para a análise do processamento das amostras foi utilizado o protocolo descrito por (DOS SANTOS et al., 2011). A amostra foi centrifugada por 5 minutos e descartado o sobrenadante. O pellet foi ressuspendido em 300 μ l de PBS/BSA, o qual foi separado em dois tubos falcon, um para o controle negativo e outro para as marcações, deixando por 30 minutos. Em seguida, o tubo que será incubado o anticorpo foi centrifugado por 5 minutos, descartado o sobrenadante e colocado 99 μ l de PBS e 1 μ l do anticorpo F4-80 (BM8 FITC - Abcam), deixando incubar por 30 minutos. Decorrido o tempo, a amostra foi novamente centrifugada por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspendido em 300 μ l de PBS/BSA, centrifugado por 5 minutos, e descartado o sobrenadante. Por fim, foi adicionado 500 μ l de PBS em cada tubo e estes foram colocados no citômetro (BD FACS Calibur) para leitura. Foram contados 10000 eventos por amostra e os resultados foram analisados usando o programa CellQuest (BD Biosciences, USA).

5.1.2.4 Análise da produção de óxido nítrico

Para a dosagem de óxido nítrico (NO) foram utilizados 50 μ l do lavado peritoneal previamente coletado e congelado para cada poço. Para a análise da produção de NO, as amostras foram descongeladas, centrifugadas por 5 minutos a uma rotação de 1200 rpm. Os sobrenadantes foram misturados na proporção de 1:1 com o reagente de Griess (1 volume de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% em água deionizada com igual volume de 0,1% N-[1-naftil] etilenodiamina em água deionizada), adicionados à uma placa de 96 poços (em triplicata) onde procedeu-se a incubação por 10 minutos. Após, a mistura foi lida na absorvância de 540 nm, em um leitor de ELISA SpectraMax 190 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA) e a quantificação da produção de NO foi baseada em uma curva padrão de nitrito de sódio em PBS (0 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M e 100 μ M).

5.1.2.5 Imunoensaio enzimático (ELISA)

Para essa análise, foi utilizado também o lavado peritoneal, coletado da mesma forma que descrito no item anterior, porém este foi centrifugado por 10 minutos a uma rotação de 4000 rpm até 30 minutos depois da coleta. Após a centrifugação, o sobrenadante foi dividido em tubo tipo eppendorf de 1,5 ml com 1 ml da amostra em cada tubo, devidamente identificado e acondicionado no freezer de -80°C até o

momento da análise. Os níveis de VEGF e PGE-2 foram quantificados por ELISA, baseado no princípio da competição por anticorpo monoclonal específico.

Para análise das concentrações de PGE foi utilizado o kit PGE-2 monoclonal EIA da Cayman Chemical (Ann Arbor, MI), conforme as recomendações do fabricante. Em resumo, foi utilizado 50 ul de amostra por poço (com no mínimo duas diluições em triplicata), 50 ul de PGE-2 AChE Tracer e 50 ul de PGE-2 anticorpo monoclonal, em seguida a placa foi coberta com plástico filme e incubada por 18 horas a 4°C. Após as 18 horas, os poços foram esvaziados e lavados com tampão de lavagem, foram adicionados 200 ul de reagente Ellman e a placa foi colocada em agitador por 60-90 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura na absorvância de 405 nm no leitor de microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA). As concentrações de PGE-2 foram automaticamente quantificadas em uma curva de calibração (coeficiente de correlação sempre maior ou igual a 0,98), utilizando-se do programa SoftMax (Molecular Device Corporation, Sunnyvale, Califórnia – EUA). O limite de quantificação foi de 7,8 pg/ml e o ponto mais alto da curva foi de 1000 pg/ml.

Para análise das concentrações de VEGF foi utilizado o kit mouse VEGF ELISA da Boster Immunoleader (Pleasanton, CA), conforme as recomendações do fabricante. Resumidamente, foi utilizado 0,1 ml de amostra por poço (com no mínimo duas diluições em triplicata), 0,1 ml de soluções padrões de VEGF por poço e 0,1 ml de tampão diluente da amostra no poço controle. Em seguida a placa foi coberta com plástico filme e incubada por 90 min a 37 °C. Após os 90 minutos, os poços foram esvaziados e lavados com tampão de lavagem, foram adicionados 0,1 ml de solução biotinilada de anticorpo anti-VEGF humano e a placa foi novamente selada com plástico filme e incubada por 60 minutos a 37 °C. Após esse procedimento, os poços foram esvaziados e lavados com tampão de lavagem sendo adicionado 0,1 ml de solução do complexo avidina-biotina-peroxidase por poço e a placa foi selada e incubada por 30 minutos a 37 °C. Após os 30 minutos, foram adicionados 90 ul de agente revelador de cor (TMB) por poço selando a placa e incubando por 20 minutos a 37 °C. Em seguida, foi realizada a leitura na absorvância de 450 nm no leitor de microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA). As concentrações de VEGF foram automaticamente quantificadas em uma curva de calibração (coeficiente de correlação sempre maior ou igual a 0,98), utilizando-se do programa SoftMax (Molecular Device Corporation, Sunnyvale, Califórnia – EUA). O

limite de quantificação foi de 15,6 pg/ml e o ponto mais alto da curva foi de 1000 pg/ml.

5.1.2.6 Ensaio de cultura celular e viabilidade

Foram cultivadas linhagens de células de macrófagos de rato J774.G8 em garrafas de plástico em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Company, St Louis, MO) suplementado com 10% de soro bovino fetal (GIBCO-Life Technologies, Rockville, MD), penicilina (100 228 U / mL), estreptomicina (100 µg / mL), glutamina (2 mM) e HEPES (15 mM, Biochrom AG) a 37 ° C em uma atmosfera humidificada de 5% de CO₂ (Figura 7). Quando as culturas se encontraram confluentes, foram tripsinizadas e centrifugadas para posteriormente serem lançadas em placas de 96 poços com RPMI a uma densidade de 2×10^4 células / ml. Essas células foram cultivadas e tratadas com 10, 20 e 40 µg / ml do extrato de açaí durante 24, 48 e 72 h. O sobrenadante foi removido e adicionado 10 µl de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em meio RPMI a cada poço e as células incubadas em câmara de CO₂ durante 3 h. Por fim, o meio foi aspirado sendo adicionado 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) às células para dissolverem. A absorvância a 538 nm foi medida com um Spectra Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

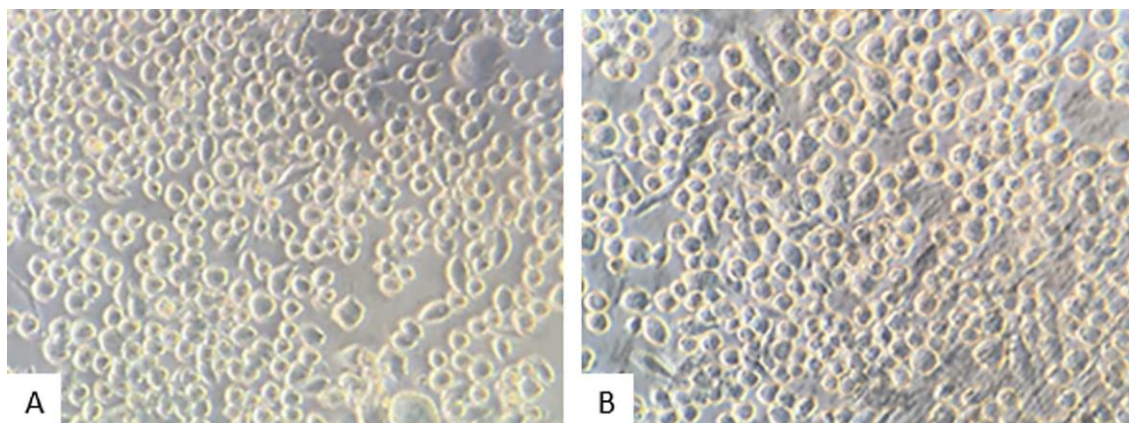


Figura 7 Observações morfológicas por microscopia de contraste de fase da linhagem de macrófagos J774.G8 cultivadas em garrafa de plástico em meio RPMI 1640 (A e B)

5.2 METODOLOGIA DA REVISÃO SISTEMÁTICA

5.2.1. Estratégia de Pesquisa

Uma pesquisa sistemática da literatura foi realizada para identificar publicações que estudaram o uso de extrato de *E. oleracea* em modelos animais experimentais de câncer e / ou avaliaram a segurança / toxicidade do açaí em modelos animais saudáveis. Os estudos foram identificados pesquisando nos bancos de dados eletrônicos: PubMed, Medline-Bireme, Lilacs e SciELO desde sua data de início até dezembro de 2017 (tabela S1). Os termos de pesquisa foram os seguintes: ("Euterpe oleracea" e tratamento do câncer) OU ("Euterpe oleracea" e modelo de câncer animal) OU (Açaí E tratamento do câncer) OU (Açaí e modelo de câncer) E ("Euterpe oleracea" E toxicidade) OU (Açaí E toxicidade). A pesquisa foi realizada sem restrições no idioma ou ano de publicação. Dois revisores (KCRB e JA-P) selecionaram os estudos qualificados de forma independente pela leitura dos títulos, resumos ou textos completos com base nos critérios de elegibilidade. As duplicatas foram removidas. Os artigos elegíveis foram separados para análise da metodologia e resultados do estudo (Tabela S1). Todos os desentendimentos foram resolvidos por discussão com dois revisores adicionais (DEM e JAP).

5.2.2. Critérios de inclusão e exclusão

Os artigos foram incluídos se os seguintes critérios foram cumpridos: (1) avaliaram o efeito farmacológico do açaí em modelos animais de câncer e / ou (2) realizaram análises toxicológicas após a administração do açaí em modelos experimentais de animais saudáveis. Os artigos foram excluídos se os seguintes critérios fossem atendidos: (1) revisões da literatura; (2) não analisou o uso de açaí *in vivo*; (3) não usou a ordem Rodentia; (4) não avaliou os efeitos toxicológicos da administração do açaí *in vivo*; e (5) utilizaram apenas modelos experimentais *in vitro*.

5.2.3. Extração de dados

Três investigadores (KCRB, JA-P e JAP) realizaram de forma independente a extração de detalhes de cada estudo, incluindo: (1) informações básicas, incluindo o ano de publicação, o nome do primeiro autor, o tipo de animais, o sexo, o modelo *in vivo* e as intervenções experimentais; (2) informações básicas sobre o tratamento do açaí, incluindo a fração e origem de *E. oleracea*, dose, via de administração, posologia,

diluentes e grupos de tratamento; e (3) medidas de resultado utilizadas para avaliar extrato de *E. oleracea*, indicações terapêuticas (farmacodinâmicas), vias de sinalização do açáí e avaliações de segurança. Quando uma única publicação incluía estudos com animais, posologia ou tipos de intervenções diferentes, esses dados foram extraídos e considerados como experiências independentes. Qualquer desentendimento em relação aos dados extraídos foi resolvido por discussão com um revisor adicional (DEM).

5.2.4. Avaliação de qualidade

Para avaliar a qualidade, dois revisores independentes (KCRB e JA-P) usaram uma escala de classificação de qualidade como uma escala de pesquisa de animais / tecidos (QATRS). O QATRS é um gráfico de avaliação escalonado de 20 pontos que foi projetado com base na randomização, cegamento, na semelhança do modelo de animal / tecido com aplicações humanas, padronização e confiabilidade das técnicas de medição, gerenciamento de levantamentos de estudos e adequação dos métodos estatísticos (BASHARDOUST TAJALI et al., 2010). Todos os desentendimentos foram resolvidos por discussão com dois revisores adicionais (DEM e JAP).

6. RESULTADOS

Os dados obtidos neste estudo constituíram dois artigos e serão apresentados individualmente em duas partes, assim denominadas: “*E. oleracea extract (açai) is a promising novel pharmacological therapeutic treatment for experimental endometriosis*”; e “*Anticancer potential, molecular mechanisms and toxicity of E. oleracea extract (Açai): A systematic review*”.

6.1 *E. oleracea extract (açai) is a promising novel pharmacological therapeutic treatment for experimental endometriosis*

Os resultados obtidos com a realização deste projeto, em atendimento ao objetivo específico 4.2.1, foram publicados na revista PlosOne, no ano de 2016, volume 11, número 11 (doi: 10.1371/journal.pone.0166059), que possui Qualis A1 na Saúde Coletiva.

Este foi o primeiro estudo a avaliar o potencial terapêutico do extrato de *Euterpe oleracea* (açai) no crescimento e sobrevivência de lesões endometrióticas, utilizando um modelo experimental de endometriose peritoneal. O tratamento com 200 mg/kg de açai, via gavagem, por 30 dias consecutivos reduziu significativamente o tamanho do implante endometriótico. O exame histológico indicou atrofia e regressão das lesões endometrióticas. Foi observada uma redução na imunomarcagem e expressão de mRNA de VEGF, MMP-9 e COX-2 no grupo tratado com açai quando comparado ao grupo controle. A imunomarcagem de F4-80 foi menor no grupo tratado comparado ao controle. O grupo que recebeu açai também exibiu concentrações mais baixas de PGE₂, VEGF e NO em comparação com o grupo controle. As células de macrófagos tratadas com 20 e 40 µg / ml de açai apresentaram redução da viabilidade celular em cerca de 50% após 24, 48 e 72 h. Esses resultados sugerem que o açai inibiu o estabelecimento e crescimento de lesões endometrióticas, sugerindo que esse extrato é um promissor para o tratamento farmacológico da endometriose.


RESEARCH ARTICLE

Euterpe oleracea Extract (Açaí) Is a Promising Novel Pharmacological Therapeutic Treatment for Experimental Endometriosis

Daniel Escorsim Machado¹, Karina Cristina Rodrigues-Baptista^{1,2}, Jessica Alessandra-Perini^{1,2}, Roberto Soares de Moura³, Thiago Alves dos Santos^{1,4}, Kariny Gomes Pereira¹, Yasmin Marinho da Silva¹, Pergentino José Cunha Souza⁵, Luiz Eurico Nasciutti⁶, Jamila Alessandra Perini^{1,2*}

1 Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, **2** Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, **3** Departamento de Farmacologia e Psicobiologia, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, **4** Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil, **5** Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil, **6** Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* jamilaperini@yahoo.com.br


 OPEN ACCESS

Citation: Machado DE, Rodrigues-Baptista KC, Alessandra-Perini J, Soares de Moura R, Santos TAd, Pereira KG, et al. (2016) *Euterpe oleracea* Extract (Açaí) Is a Promising Novel Pharmacological Therapeutic Treatment for Experimental Endometriosis. PLoS ONE 11(11): e0166059. doi:10.1371/journal.pone.0166059

Editor: Shengtao Zhou, West China Second Hospital, Sichuan University, CHINA

Received: May 5, 2016

Accepted: October 21, 2016

Published: November 16, 2016

Copyright: © 2016 Machado et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was funded by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, Brazil (E-26/010.002619/2014 and E-26/010.002644/2014).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

This study investigated the therapeutic potential of *Euterpe oleracea* extract (açaí) on the growth and survival of endometriotic lesions using an experimental model. Twenty female Sprague-Dawley rats were randomized into two groups after the implantation and establishment of autologous endometrium onto the peritoneum abdominal wall and treated with 200 mg/kg hydroalcoholic solution extract from açaí stone or vehicle via gastric tube for 30 consecutive days. Body weight, lesion surface areas, histological and immunohistochemistry analyses of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor-2 (VEGFR-2), metalloproteinase-9 (MMP-9), cyclooxygenase-2 (COX-2) and F4-80 were performed. Levels of VEGF, VEGFR-2, MMP-9 and COX-2 mRNA were measured. Flow cytometry of F4-80 was performed, and ELISA immunoassays measured prostaglandin E₂ (PGE₂), VEGF and nitric oxide (NO) and concentrations. Macrophage cell line J774.G8 was treated with 10, 20, and 40 µg/mL of açaí for 24, 48 and 72 h, and cell viability was measured using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays. Açaí treatment significantly decreased the implant size, and histological examination indicated atrophy and regression. A reduction in immunostaining and mRNA expression of VEGF, MMP-9 and COX-2 was observed, and F4-80 was lower in the treated group than the control group. The treated group also exhibited lower concentrations of PGE₂, VEGF and NO compared to the control group. Macrophages cells treated with 20 and 40 µg/ml of açaí reduced cell viability in about 50% after 24, 48 and 72 h. Our results suggest that açaí effectively suppressed the establishment and growth of endometriotic lesions, and this agent is a promising novel pharmacological therapeutic treatment for endometriosis.

Introduction

Endometriosis is defined as the presence of functional endometrium outside the uterine cavity that consists of proliferating functional endometrial glands and stroma [1]. It is an inflammatory disease associated with chronic pelvic pain and infertility, and it results in a markedly reduced quality of life [2]. The prevalence of the disease is in 5–10% of women of reproductive age [3].

The exact pathogenic mechanisms of endometriosis are not known, but several studies demonstrated that the development of a new vascular supply was essential for the establishment and growth of endometriotic lesions [4–6]. Various lines of evidence indicate that growth factors, including vascular endothelial growth factor (VEGF), cytokines and prostaglandins promote the development of endometriosis [7–9]. Notably, endometriotic lesions exhibit increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression compared to eutopic endometrium [10]. COX-2 and VEGF studies are associated with endometriosis and reinforce the hypothesis that the angiogenesis process and inflammation are crucial to the pathophysiology of this disease [8,11,12].

The current treatment for endometriosis is medical and/or surgical. Hormone therapy is the commonly used medical treatment, and it involves oral contraceptives, progestogens and gonadotropin-releasing hormone agonists, which induce a hypoestrogenic state [13]. However, these therapies can only be prescribed for a short time because of serious adverse effects, such as pseudomenopause, massive hemorrhage and bone density loss. The disease recurs within 3–5 years in 30–50% of women after surgical removal of endometriosis lesions [14]. Therefore, the search for additional strategies to effectively treat endometriosis is fundamental.

Euterpe oleracea Mart. (Arecaceae), popularly known as “açaí”, is an economically important plant that is found widely in the Amazon region of Brazil. Chemical studies demonstrated that açaí exhibits a diverse composition of hydroxybenzoic acids, antioxidant polyphenolics, flavan-3-ols, and anthocyanins, predominantly cyanidin 3-O-rutinoside and cyanidin 3-O-glucuronide [15–19]. Açaí exhibits antioxidant, antinociceptive, anti-inflammatory and anti-cancer activities because of its high level of phytochemicals [20–26]. Açaí exhibits exceptional activity against superoxides, inhibits reactive oxygen species (ROS) formation and may inhibit COX-2 [27]. A significant antinociceptive effect of açaí was observed in a spinal nerve ligation model in rats, which suggests the possible development of a new analgesic drug [26]. Recently, Marques *et al.* conducted cytogenetic tests with three doses of açaí in rat cells, and showed that açaí had no significant genotoxic effects in the analyzed cells [28].

Endometriosis is an inflammatory disease and açaí extract may be an effective treatment strategy. The present study investigated the pharmacological effects of açaí on the establishment and growth of endometriotic lesions using an experimental model. We used several assays to investigate anti-inflammatory functions, including an activated macrophage study and nitric oxide (NO) assay. We also investigated whether açaí modulated the angiogenesis process to better understand the mechanisms of action of the extract in the development of endometriosis.

Materials and Methods

Preparation of açaí extract

Açaí fruits were obtained from the Amazon Bay (Belém do Pará, Pará, Brazil), excicata number 29052 Museu Goeldi–Belém do Pará, and these study has been authorized by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq (Authorization: 010564/2015-2). We used in our study the hydroalcoholic solution extracted from açaí stones, as previously

described [22,23,26]. Briefly, 200 g of açaí stone were boiled in 400 ml of distilled water for 10 min with mixed for 2 min. The decoction was cooled to room temperature and extracted by addition of 400 ml of ethanol with shaking for 2 h. The hydroalcoholic extract was stored (4°C) for 10 days and filtered through Whatman filter paper. Ethanol was evaporated under low pressure at 55°C. The extract was lyophilized (Fisatom Equipamentos Científicos Ltda São Paulo) at temperatures from -30 to -40°C and under a vacuum of 200 mmHg, and frozen at -20°C.

Experimental animal model

Animals were treated in accordance with protocols approved by the State University of West Zone (UEZO) Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA), protocol code CEUA-UEZO-002/2013, and all experiments were conducted in accordance with the ethical guidelines from the CEUA and the NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>, 8th Edition; 2011).

Twenty female Sprague-Dawley rats (250–300 g) were used after reaching maturity at 8 weeks of age and were housed in polyethylene cages in the Bioterium of UEZO, and were kept at a constant temperature (25°C) under a 12-h light/dark cycle with free access to food and water.

With use of the method described by Vernon and Wilson [29], the animals were anesthetized with intramuscular injection of ketamine and xylazine. The abdomen was opened through a 3-cm midline incision to expose the uterus. One uterine horn was removed and the segment was placed in phosphate-buffered saline at 37°C and split longitudinally, 5×5 mm pieces were sectioned and anchored with the endometrium side onto the peritoneum of the ventral abdominal wall by nonadsorbable polypropylene sutures (6–0 Prolene, Ethicon, Piscataway, NJ). Then, the abdomen was closed and the animals were allowed to recover from anesthesia.

Animal Treatment

Two weeks after the initial implant, ventral midline laparotomy was performed to determine the attachment and viability of endometrial explants. The animals were divided randomly into two groups of each ten animals: açaí group was treated with daily 200 mg/kg body weight, dissolved in saline, by gastric tube for 30 consecutive days, and control group received saline as vehicle by gastric tube for 30 consecutive days. Body weight was measured every three day. After treatment, the rats were euthanized by anesthesia overdose, the peritoneal fluid was collected to flow cytometry, ELISA immunoassay and NO dosage, and the surface areas of the explant (length x width) were evaluated using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MN). Each sample was dissected and immediately divided into one piece that was fixed in 10% buffered formalin and paraffin embedded for histologic and immunohistochemical studies, and another piece that was frozen in liquid nitrogen for RNA extraction.

Histology and Immunohistochemistry

Formalin-fixed tissues were paraffin-embedded and cut into 4-micrometers-thick sections. Part of the sections were stained with Harris hematoxylin and eosin (HE), and examined microscopically at 200× magnification for the presence of histological hallmarks of endometriosis, such as endometrial glands and stroma. The other paraffin-embedded tissue sections were placed on silane-treated slides, and maintained at room temperature, as previously described [30]. Sections were incubated with the following antibodies: monoclonal antibody against VEGF SC-57496 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at 1:100 dilution,

monoclonal antibody against Flk-1 SC-6251 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at 1:100 dilution, polyclonal antibody against metalloproteinase-9 (MMP-9) SC-6840 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at 1:200 dilution, polyclonal antibody against COX-2 SC-1747 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at 1:100 dilution, and monoclonal antibody against F4-80 macrophage antigen SC-26642 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at 1:200 dilution. Incubations were carried out overnight and then revealed using LSAB2 Kit HRP, rat (Dako-Cytomation, Carpinteria, CA) with diaminobenzidine (3,3'-diaminobenzidine tablets; Sigma, St. Louis, MO) as the chromogen and counterstained with hematoxylin. For each case, negative control slides consisted of sections incubated with antibody vehicle or no immune rabbit or mouse serum.

Morphometric analysis

All tissues were examined by two blinded observers using a 400× magnification on light microscope (Nikon, Tokyo, Japan) connected to a digital camera (Coolpix 990; Nikon). Ten fields of an immunostained section (VEGF, VEGFR-2, MMP-9, COX-2 and F4-80) were chosen at random and captured from each specimen. Quantification was assessed on captured high-quality images (2048 × 1536 pixels buffer) using the Image Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Data were stored in Adobe Photoshop, version 3.0, to enable uneven illumination and background color to be corrected. Histologic scores (H) for VEGF, VEGFR-2, MMP-9, COX-2 and F4-80 were calculated using the formula $H = \sum I_i$, where I_i is the intensity ranging from 0 (negative cells) to 3 (deeply staining cells) and P is the percentage of staining cells for each given i , with P values of 1, 2, 3, 4, and 5 indicating <15%, 15–50%, 50–85%, >85%, and 100% positive-staining cells, respectively. The staining result was expressed as mean ± standard deviations.

TaqMan real-time reverse transcription-polymerase chain reaction

The m-RNA levels were quantified by TaqMan real-time polymerase chain reaction. RNA from endometriosis samples was isolated using the Trizol[®] reagent according to the manufacturer's instructions, and quantified by the Nanodrop[®] spectrophotometer. Two micrograms of total RNA was used as a template for cDNA synthesis, using the SuperScript II[®] reverse transcriptase kit (Invitrogen[®]). TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems[®]) and a validated TaqMan assay was purchased from Applied Biosystems, and were used to quantify mouse *VEGF* (Mm01281449_m1), kinase insert domain receptor (*KDR*), gene which encodes VEGFR-2 (Mm01222421_m1), *MMP-9* (Mm004422991_m1) and *PTGS*, gene which encodes COX-2 (Mm00478374_m1) expression levels, with [glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase](#) (*GAPDH*) (Mm9999915_g1) as an endogenous control. Triplicate TaqMan PCR assays for each gene target were performed in cDNA samples. Real-time reactions were conducted in a 7500 Real-Time thermocycler (Applied Biosystems[®]). The relative quantification of the target genes was performed using the Delta-Delta Ct method.

ELISA Immunoassay

Peritoneal fluid was collected by rinsing the abdominal cavity with 10 mL of PBS and immediately centrifuged at 1500 rpm during 10 min. Supernatants were stored at -70°C until assayed for VEGF and PGE₂ by use of an enzyme immunoassay kit (Boster Biological Technology, Pleasanton, CA and Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), according to manufacturer's instructions. The concentrations were calculated from standard curves and all samples were assessed in triplicate. The VEGF and PGE₂ measurement were performed by an automatic plate reader

(Spectra Max; Molecular Devices, Sunnyvale, Calif) controlled by SoftMax software (Molecular Devices).

Flow cytometry

Peritoneal fluid was obtained *ex vivo* from rat after the treatments by washing twice with PBS, pH 7.2 containing 3% Fetal Bovine Serum (FBS) for flow cytometry analysis. For the control group, the same procedure was conducted. The cells were incubated with Fc blocking (done 2.4G2) for 10 min. Before, the cells were incubated with monoclonal antibody FITC anti-F4/80 (BD Biosciences, USA). Samples were analyzed on a flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences, USA), 10,000 events were counted for each animal sample and the data was analyzed using CellQuest (BD Biosciences, USA) and WinMDI 2.9 software packages.

Nitric oxide analysis

The production of NO was performed as described by Green *et al.* [31]. Supernatants were mixed in a ratio of 1:1 with the Griess reagent (1:1 volume 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid in deionized water with an equal volume of 0.1% N-[1-naphthyl]-ethylenediamine in deionized water). After 10 minutes, the mixture was read in an ELISA reader (540 nm) and quantification of NO production was based on a sodium nitrite standard curve.

Cell Culture and viability assay

The mouse macrophage cell line J774.G8 were grown in plastic bottles in a RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Company, St Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO-Life Technologies, Rockville, MD), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), glutamine (2 mM) and HEPES (15 mM; Biochrom AG) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ (S1 Fig).

When cultures formed a confluent, monolayer cells were scrapped, centrifuged and put to adhere in 96 wells plate with RPMI at a density of 2×10^4 cell/ml. The cultured cells were treated with 10, 20, and 40 µg/ml of the Açaí extracts for 24, 48 and 72 h. The supernatant was removed, and 10 µl of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) in RPMI medium was added to each well. Cells were incubated in a CO₂ chamber for 3 h with protection from light. After the medium were aspirated, 100 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to the cells to dissolve the formazan. The absorbance at 538 nm was measured with a Spectra Max 190 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard deviations (SD). Statistical comparisons between treated group and control were performed with Student t-test. For VEGF, VEGFR-2, MMP-9, COX-2 and F4-80 morphometric analysis, statistical calculations were carried out with use of the Stat-Xact-5 software program (CYTEL Software Corporation, Cambridge, MA). The relative quantification of the target genes was carried out using Delta-Delta Ct method. Cell culture and viability assay experiments were performed in triplicate (n = 3) and the data were expressed as mean ± SD. The Student-Newman-Keuls test was used to assess the presence of statistical differences between the groups when a statistically significant association was described by ANOVA. The level of significance for significant difference between groups was set at P < 0.05 in all analyses.

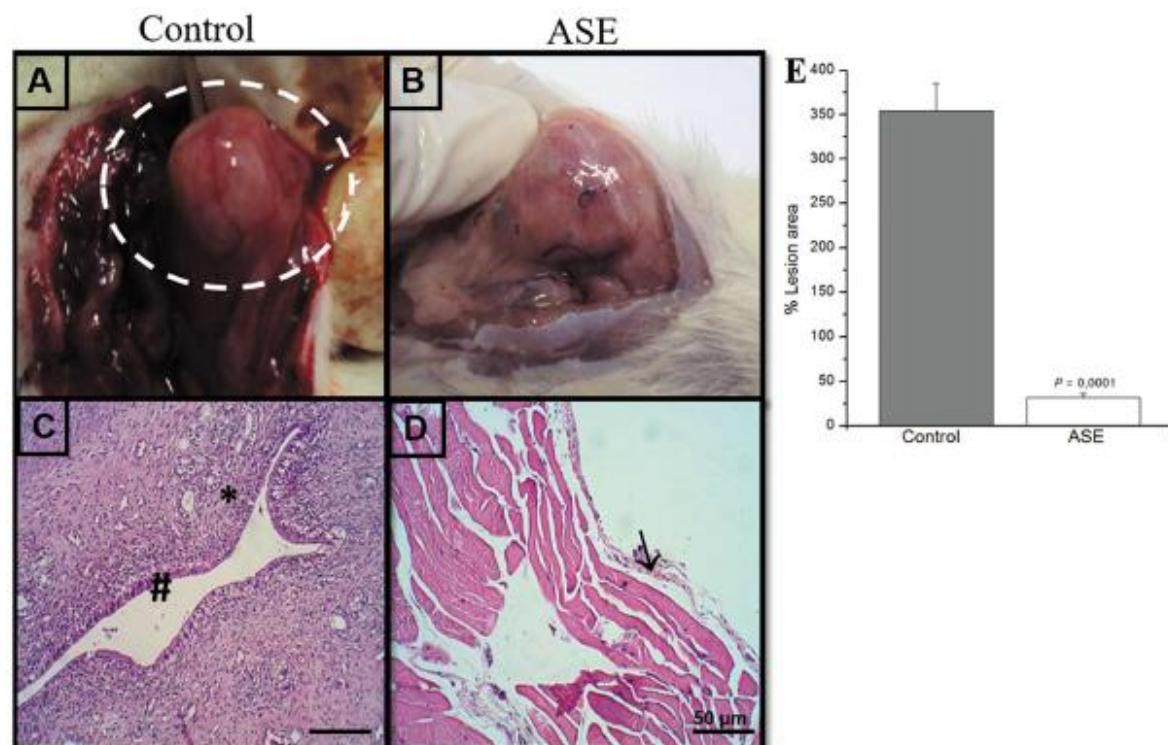


Fig 1. Morphological characteristics of rat peritoneal endometriotic lesions in control and açai treated groups. In the control group (A), the lesions were cystic and vascularized and resembled human peritoneal endometriosis. In the açai group (B), a drastic reduction in the growth of the lesions was visualized. Histologically, the control group (C) showed the presence of endometrial glands (#) and stroma cells (*), which confirmed the viability of lesions. In the açai group (D), there was tissue atrophy and regression of lesions (—). Measurements of the lesion area demonstrated a statistically significant difference between the groups (E).

doi:10.1371/journal.pone.0166059.g001

Results

Açaí Suppresses Endometriosis Growth

The endometrial explants formed viable cystic and well-vascularized lesions after 15 days in all 20 animals (Fig 1A). The histopathological results revealed typical endometrial components, such as glands and stroma, which confirmed the viability of the lesions (Fig 1C). The maintenance and growth of the lesions were suppressed in the treated animals group, and an important decrease in implant size was observed (Fig 1B). The histological analyses revealed atrophy and regression of the lesion areas (Fig 1D). Measurements of the lesions area confirmed these observations, which were significantly different between the two groups (Fig 1E). There was no significant difference in weight over time between the treated açai group and the control group (data not shown).

Açaí Inhibits Angiogenesis in Experimental Endometriosis

The angiogenesis process was investigated using mRNA expression, immunostaining and ELISA immunoassays based on MMP-9, VEGF and its receptor VEGFR-2 (S1 Table).

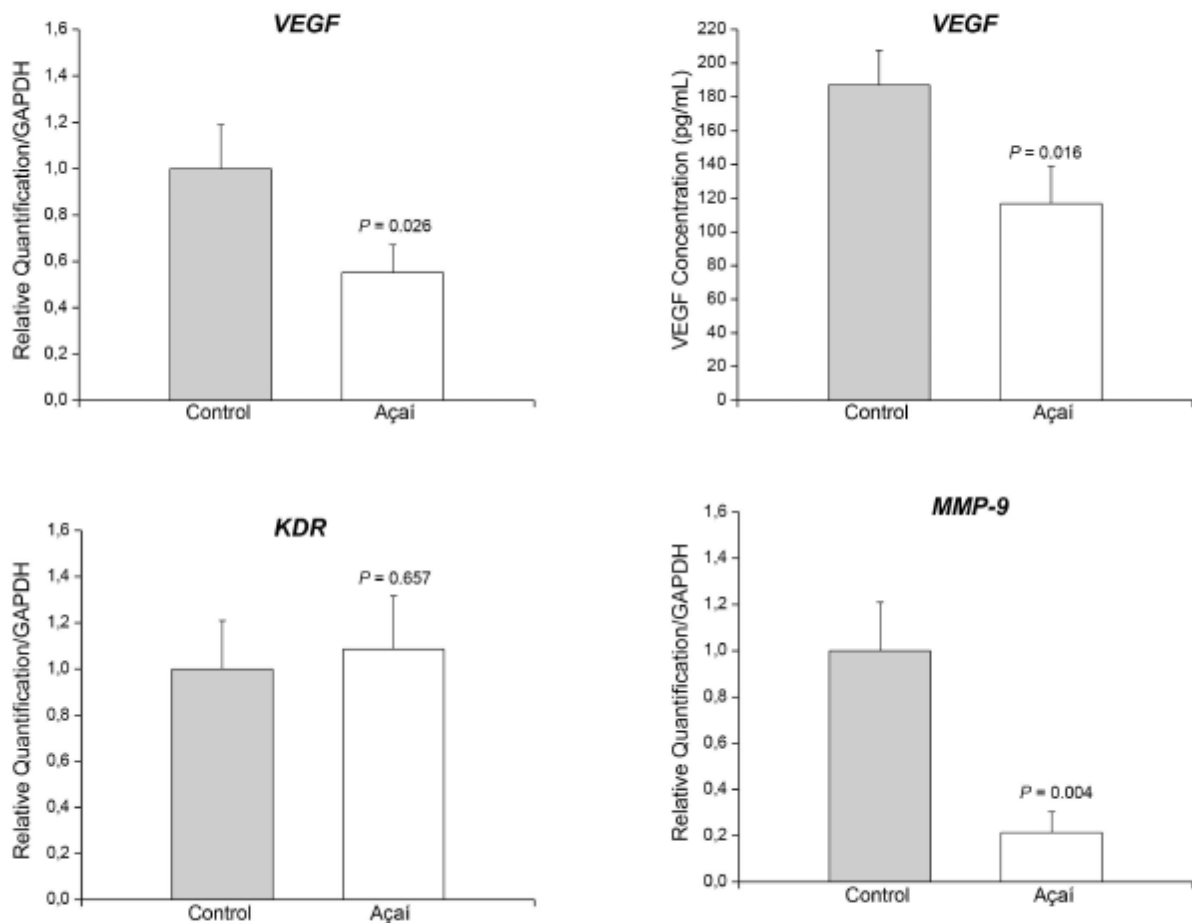


Fig 2. Açaí inhibits angiogenesis in experimental endometriosis. Expression of mRNA encoding for VEGF (A), KDR (C) and MMP-9 (D) assayed using RT-PCR. VEGF concentrations (B) were measured using ELISA immunoassays in control endometriosis lesions and lesions treated with açaí. The levels of VEGF and MMP-9 mRNA transcripts and VEGF concentrations in the treated endometriotic lesions were significantly lower than the levels in the control lesions.

doi:10.1371/journal.pone.0166059.g002

Quantitative real-time PCR demonstrated suppression of the levels of VEGF (Fig 2A) and MMP-9 (Fig 2D) mRNA transcripts, and ELISA revealed a decrease in VEGF concentration (Fig 2B) in the endometriotic lesions treated compared to the control group. However, KDR mRNA transcripts were not different among the two groups (Fig 2C). VEGF, VEGFR-2 and MMP-9 immunoreactivity was detected in the lesions, predominantly in the stroma, around the glands, and in the cytoplasm of endothelial cells in non-treated endometriosis. The distribution of these three angiogenic markers decreased in endometriosis animals treated with açaí (Fig 3D, 3E and 3F) compared to the control group (Fig 3A, 3B and 3C). Histochemistry evaluations of VEGF, VEGFR-2 and MMP-9 confirmed the observation of significant decreases ($P = .0001$) in these markers in endometriosis animals treated with açaí (2.5 ± 0.9 , 2.8 ± 0.6 and 4.2 ± 0.8 , respectively) compared to the control group (22.1 ± 1.1 , 25.4 ± 2.5 and 27.5 ± 2.4 , respectively).

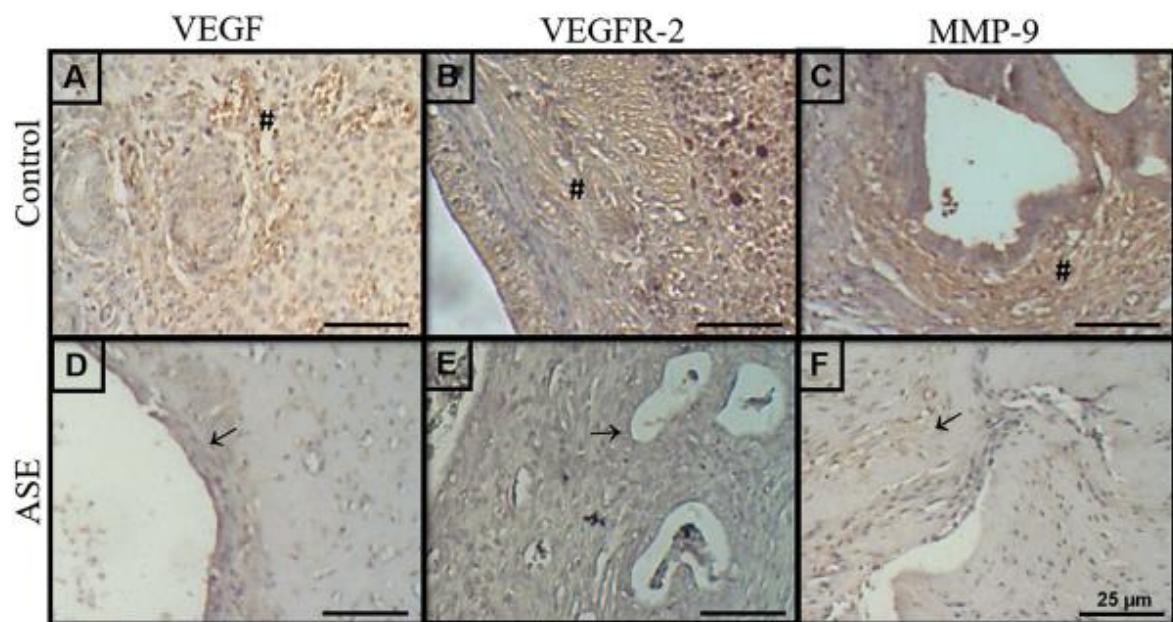


Fig 3. Açaí decreased angiogenesis markers immunodistribution in endometriosis. The immunoreactivity of VEGF, VEGFR-2 and MMP-9 was detected predominantly in the stroma (#), primarily around the glands in untreated endometriosis (A, B, C). Treated endometriotic lesions (D, E, F) exhibited a significant decrease in reaction intensity (→).

doi:10.1371/journal.pone.0166059.g003

Anti-inflammatory effect of açaí on endometriotic lesions

The inflammatory profile of endometriotic lesions was analyzed using COX-2 mRNA expression, COX-2 immunostaining, and an ELISA immunoassay of prostaglandin 2 (PGE₂) (S2 Table). The level of COX-2 mRNA transcripts (Fig 4A) and the intensity of the COX-2 reaction (Fig 4C) were reduced in endometriotic lesions treated with açaí compared to the control group (Fig 4B). Histomorphometry evaluation of COX-2 was significantly smaller ($P = .0001$) in endometriosis animals treated with açaí (5.9 ± 0.5) compared to the control group (30.8 ± 1.7). PGE₂ (Fig 4D) and NO (Fig 4E) concentrations were significantly higher in the control group compared to the açaí group, which demonstrated the anti-inflammatory potential of the extract.

Açaí decreased levels of macrophages

We analyzed the presence of F4/80-positive cells in the endometriotic lesions of both groups because of the role of macrophages in angiogenesis and inflammation. We identified a decrease in the number of macrophage-positive cells in treated endometriotic lesions (Fig 5B) compared to the control group (Fig 5A). We analyzed the presence of these cells in endometriotic tissue using immunostaining of a macrophage activation marker to confirm these observations. We observed an important decrease in the number of positive cells in the stroma compartment in the treated group (Fig 5D) compared to the control group (Fig 5C). The histological scores of F4-80 immunostaining (S3 Table) confirmed these results (control, 49.3 ± 2.1 versus açaí 15.3 ± 1.0 , $P = .0001$). We also performed the viability assay using macrophage cell

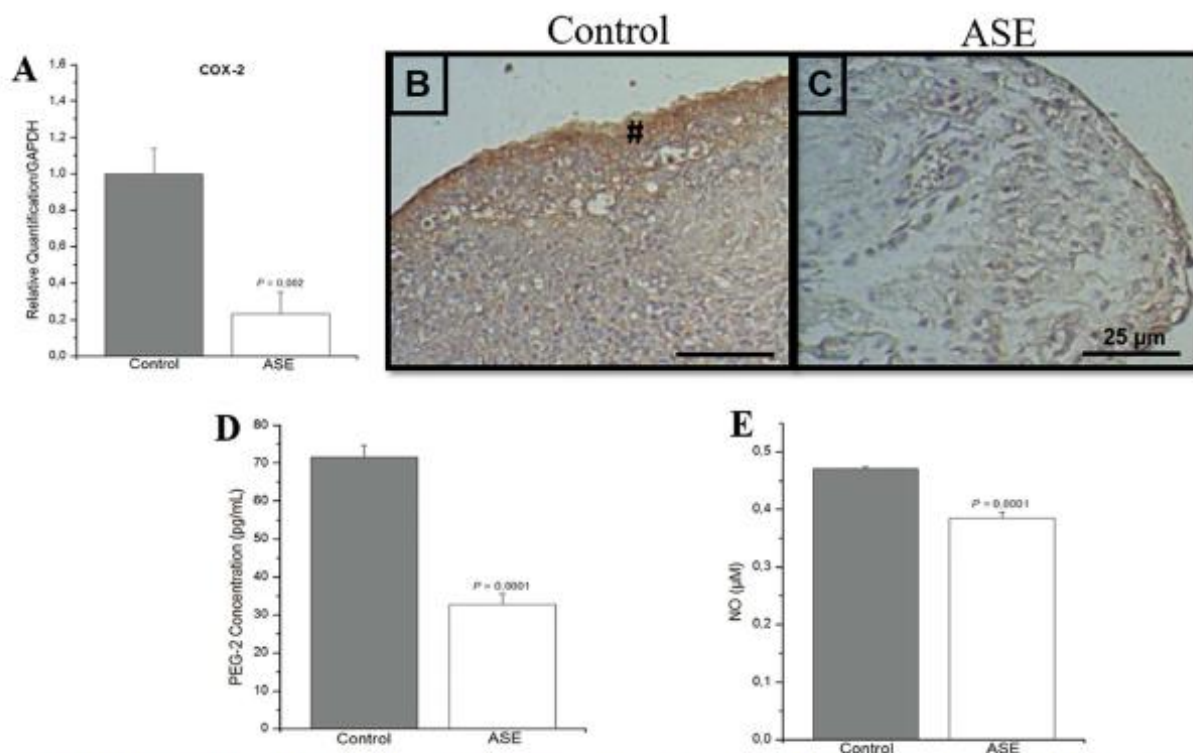


Fig 4. Anti-inflammatory effect of açaí on endometriotic lesions. COX-2 mRNA transcripts in the control group were higher than the açaí group (A). COX-2 immuno reactivity was detected predominantly in the glandular epithelial cells (#) in the control group (B) compared to lesions treated with açaí (C). PGE₂ levels (D) and NO production (E) were higher in the control group than in the açaí group.

doi:10.1371/journal.pone.0166059.g004

line J774.G8 treated with 10, 20 and 40 μ g/ml of açaí after 24, 48 and 72 h, and observed the significantly decreased the viability of macrophages cells in all açaí-treated, except treatment with 10 μ g/ml for 24 h (Fig 5D). Macrophages cells treated with 20 and 40 μ g/ml of açaí reduced cell viability in about 50% after all times, reinforcing the hypothesis that the açaí acts directly in the macrophage decrease. In addition, we made hematological analyses and observed a marked lymphocytosis in control animals compared to the açaí group (S3 Table). A recovery of leukocyte numbers to normal parameters was observed in the açaí group compared to the group of animals without endometriosis (data not shown).

Discussion

Endometriosis frequently produces serious effects on professional, social and marital life because it is associated with infertility and severe and incapacitating painful symptoms, including chronic pelvic pain, dysmenorrhea and dyspareunia [3,32]. Therefore, pharmacological treatments for endometriosis maintain a hypoestrogenic environment and relieve pelvic pain, but the side effects of these therapies limit their long-term use. Natural therapies were used recently for the treatment of various inflammatory diseases, and these therapies may be an effective treatment strategy for endometriosis [33,34].

Several studies demonstrated that açaí possesses high levels of phytochemicals with antioxidant, antinociceptive, anti-inflammatory, hypocholesterolemic, and anticancer activities

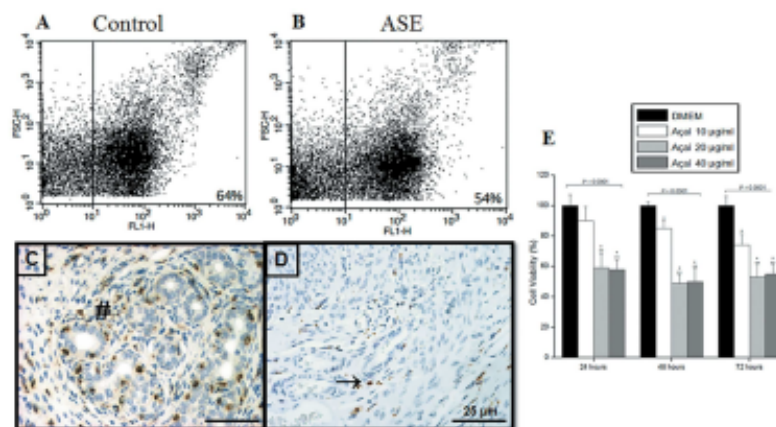


Fig 5. Açaí decreased levels of macrophages *in vivo* and *in vitro*. FACS analysis (A and B) of the macrophage phenotype (FL1-H) revealed fewer macrophages in the treated group than the control group population. F4-80 immunoreactivity (C and D) revealed that the higher number of positive macrophages in the stroma, primarily around the glands in control endometriosis (#) was drastically reduced in açaí treated lesions (→). Similarly, the MTT assay showed that the extract of açaí caused significant reduction in macrophage cell line viability after 24, 48 and 72 h of treatment (E). Values are mean \pm standard deviations, and P = ANOVA test. *Significant difference compared to DMEM group and **significant difference compared to açaí 10 μ g/ml group (Student-Newman-Keuls test, $P < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0166059.g005

[20–26, 35, 36]. To our knowledge, this report is the first study to evaluate the anti-inflammatory and antiangiogenic effects of açaí in endometriotic implants. Notably, our study used the hydro-alcoholic extracted from açaí stones because this extract was previously described to be more active than the pulp extract [25, 37].

An important decrease in the implant size was observed in the animals treated with açaí, and the histopathological findings revealed marked atrophy and lesion regression. Other phytochemicals also suppressed endometriosis in a murine model. Ergenoglu *et al.* used the natural polyphenol resveratrol and demonstrated a significant reduction in implant size and considerable histological changes in endometrial foci at the end of the treatment period [38]. Another study examined the effects of a plant polyphenol extracted from the traditional Chinese medicine turmeric, curcumin, on endometriosis. Curcumin treatment decreased the ectopic endometrial glands and narrowed the lumen [39]. These studies support the potential application of phytochemicals as endometriosis treatments.

Angiogenesis is pivotally important in the development of endometriosis [40, 41], and antiangiogenic agents from different substance groups are discussed as possible candidates for a new therapeutic approach [42–44]. Açaí treated animals in our study exhibited reduced VEGF expression, which is the most prominent pro-angiogenic factor in endometriosis. Similar results of reduced VEGF expression were reported in endometriosis models treated with a pro-drug of green tea and epigallocatechin-3-gallate [45–48]. We also demonstrated that the açaí extract decreased VEGFR-2 distribution. These results are important because the binding of VEGF to VEGFR-2 enhances endothelial cell migration, proliferation and the release of various proteolytic enzymes [49].

Endometriosis is considered a benign disease, but it often presents characteristics of malignancy [40, 50]. Women with endometriosis also exhibit an increased risk of cancer, especially ovarian cancer [50, 51], which primarily occurs because both conditions require angiogenesis for maintenance and growth [52]. Some studies demonstrated an anti-tumorigenic activity of

açaí in HL-60 leukemia cells and attenuation of colon carcinogenesis in rats [53,54]. Silva *et al.* demonstrated the anticancer activity of açaí in different malignant cell lines [25]. These authors concluded that the extract exhibited anti-tumorigenic potential in the human breast cancer MCF-7 cells and reduced viability and morphological alterations [25]. These results may be attributed to the rich content of polyphenols, anthocyanin and flavonoids in açaí because these substances possess anticancer activity [25,53,54].

The invasive properties of endometriotic tissue are also related to the increased proteolytic activity and matrix remodeling. MMPs are essential for the degradation of the extracellular matrix, which contributes to endometriosis development [55,56]. Our study demonstrated that açaí played an important role in reducing the MMP-9 levels in endometriotic lesions. Similar studies using curcumin also demonstrated reduced MMP expression in the intrinsic apoptotic pathway [57,58]. Some authors reported that the increase in ROS was a major factor that increased MMP expression and activity [59,60]. Costa *et al.* demonstrated that açaí treatment downregulated MMPs in experimental hypertension, and suggested that this downregulation was the result of the antioxidant activity of açaí [35].

High levels of ROS are generated in endometriosis and induce cell damage and proliferation [61], which supports the important role of peritoneal macrophages in the secretion of pro-inflammatory/proangiogenic cytokines [56,62]. Our findings demonstrated that the presence of F4/80-positive macrophages and NO concentrations were higher in endometriotic lesions and statistically reduced in animals treated with açaí. These results support the role of flavonoids as the major polyphenols in açaí that exhibit large anti-oxidant activity [19]. Several studies described the pivotal importance of macrophages in pathophysiology of endometriosis [4,8,40,56] and we also demonstrated that açaí decreased the viability of macrophages line cells *in vitro*. Therefore, we suggest that açaí decrease of macrophages hence reduced ROS production and decreased the inflammatory and angiogenesis processes in endometriotic lesions.

We also investigated COX-2 and PGE₂ signals to elucidate the mechanisms of action of açaí in the endometriosis inflammatory process. Several authors previously described that PGE₂ induced VEGF and played an important role in the pathogenesis of endometriosis [56,63,64]. We observed reduced COX-2 and PGE₂ levels in animals treated with açaí, and this result was likely due to the high levels of anthocyanin in açaí [65]. Notably, the suppression of COX-2 expression by açaí may be a prerequisite for the effective control of endometriosis-related pain. This hypothesis is supported by the significant and potent antinociceptive effect of this extract in rodent models of acute and neuropathic pain [26].

Considerable evidence supports that a diet rich in polyphenols reduces the risk for many pathological conditions, including cardiovascular disease and cancer [66]. However, studies demonstrated an effect of fruits and vegetables on the risk of cancer, and many of the tested extracts have genotoxic potential [67,68]. Ribeiro *et al.* investigated the genotoxicity of açaí in bone marrow, peripheral blood, liver and kidney cells of mice using the micronuclei test and comet assay [69]. The results demonstrated that gavage administration of açaí was not genotoxic in mice, and its components may be exploited as a promoter of good health [69].

Finally, based on the results of this study and the previous ones, we propose a mechanism for the therapeutic effects of açaí for endometriosis (Fig 6). Macrophages play a key role in inflammatory and angiogenesis of endometriosis. We know that the macrophages are an important source of VEGF and it is essential in the establishment and growth of endometriotic lesion [4,40,70]. High concentration of VEGF returns to activated macrophage and bind with VEGFR-2. This signaling upregulating the MMP-9 transcription induces the extracellular matrix remodeling promoting the increase of the vascular density [71]. Moreover, the

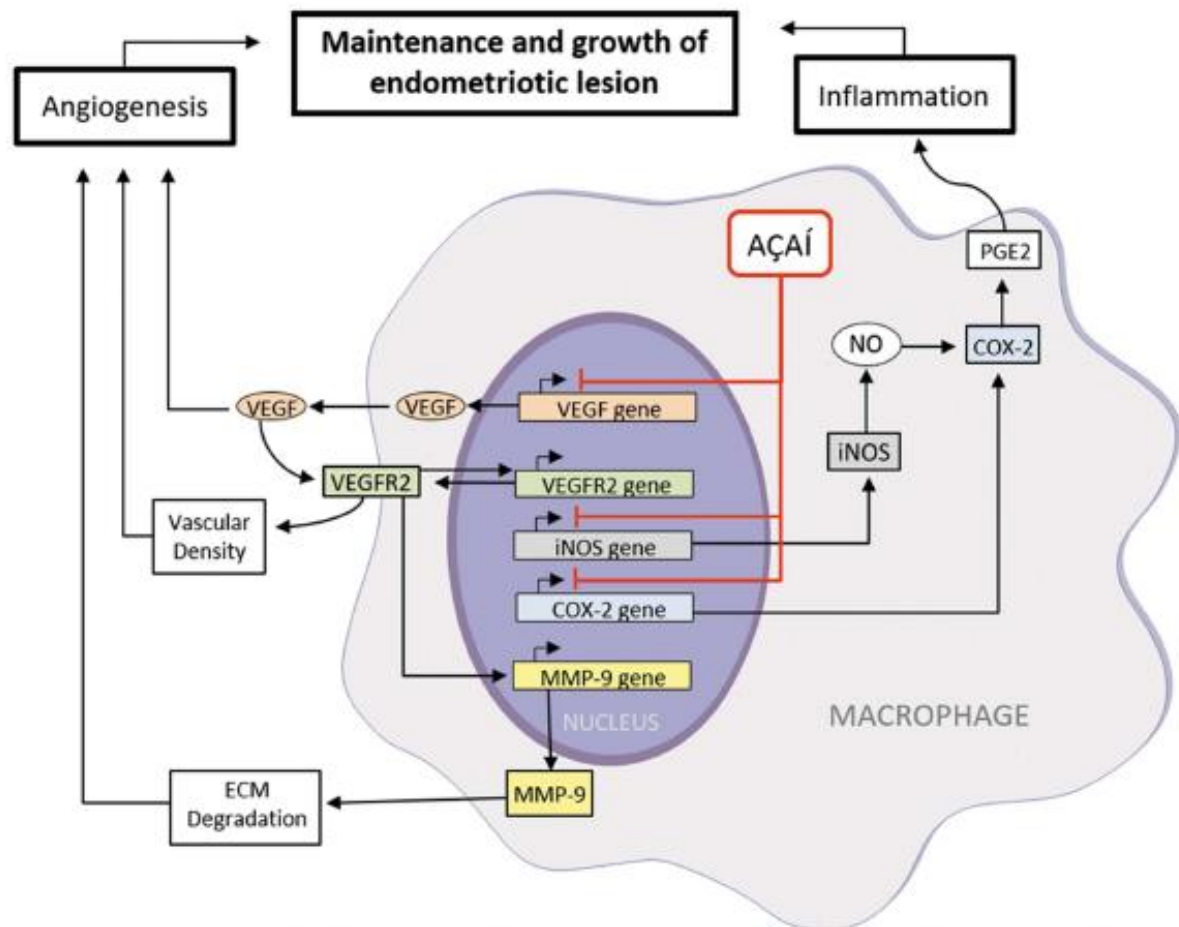


Fig 6. Açaí signaling pathways in endometriosis. In the endometriotic microenvironment, the macrophages are essential to promote the angiogenesis process and inflammation because it leads to increase the VEGF, iNOS and COX-2 genes expression. Açaí acts in this pathway and decreases the number of activated macrophages resulting in the reduction of the target genes expression, suppressing the maintenance and growth of endometriotic lesion.

doi:10.1371/journal.pone.0166059.g006

activated macrophages synthesize high concentration of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and generate NO [61]. On the other hand, this process increased the COX-2 and PGE2 levels to enhance the inflammatory process and angiogenesis [56,63,64]. Therefore, we propose that açaí decreases the number of activated macrophages resulting in the reduction of the target genes expression, such as VEGF, iNOS and COX-2 suppressing the maintenance and growth of endometriotic lesion.

Conclusions

In conclusion, the results of this study demonstrated the antiangiogenic and anti-inflammatory potential of açaí, which produced morphological alterations in endometriotic lesions. Açaí may also modulate the progress of endometriosis and suppress the symptoms related to pain, which supports the possible development of a novel and effective drug. The actual

mechanisms of the beneficial effects of açaí on endometriotic lesions are not completely understood, but we are optimistic that these effects will be reproducible in clinical tests, and we will continue our research of this extract.

Supporting Information

S1 Fig. Macrophage cell line. Morphology observations by phase-contrast microscopy of macrophage cell line J774.G8 in plastic bottles cultivated in a RPMI 1640 medium (A and B). (TIF)

S1 Table. Immunostaining and ELISA immunoassays based on MMP-9, VEGF and its receptor VEGFR-2. (XLS)

S2 Table. COX-2 immunostaining, and an ELISA immunoassay of PGE₂. (XLS)

S3 Table. F4-80 immunostaining, and hematological analyses. (XLS)

Acknowledgments

This study was supported by the Brazilian agency Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro—FAPERJ, Brazil (E-26/010.002619/2014 and E-26/010.002644/2014).

Author Contributions

Conceptualization: DEM JAP RSM LEN.

Formal analysis: DEM JAP JA-P.

Funding acquisition: DEM JAP RSM LEN.

Investigation: DEM JAP RSM KCR-B JA-P TAS KGP YMS.

Methodology: DEM JAP RSM KCR-B JA-P.

Project administration: DEM JAP RSM LEN.

Resources: DEM JAP RSM TAS PJCS LEN.

Supervision: DEM JAP.

Validation: DEM JAP RSM LEN.

Visualization: DEM TAS LEN.

Writing – original draft: DEM JAP KCR-B JA-P.

Writing – review & editing: DEM JAP RSM KCR-B JA-P TAS LEN.

References

1. Galle PC. Clinical presentation and diagnosis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1989; 16: 29–42. PMID: [2664621](#)
2. Simoens S, Dunselman G, Dirksen C, Hummelshoj L, Bokor A, Brandes I, et al. The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Hum Reprod.* 2012; 27: 1292–9. doi: [10.1093/humrep/des073](#) PMID: [22422778](#)

3. Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med.* 2009; 360: 268–79. doi: [10.1056/NEJMra0804630](https://doi.org/10.1056/NEJMra0804630) PMID: [19144942](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19144942/)
4. McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update.* 2000; 6: 45–55. PMID: [10711829](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10711829/)
5. Gilibert-Estelles J, Ramón LA, España F, Gilibert J, Vila V, Réganon E, et al. Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems. *Hum Reprod.* 2007; 22: 2120–7. doi: [10.1093/humrep/dem149](https://doi.org/10.1093/humrep/dem149) PMID: [17609243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17609243/)
6. Machado DE, Abrão MS, Berardo PT, Takiya CM, Nasciutti LE. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. *Fertil Steril.* 2008; 90: 148–55. doi: [10.1016/j.fertnstert.2007.05.076](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.05.076) PMID: [17765237](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17765237/)
7. Wu MH, Shoji Y, Chuang PC, Tsai SJ. Endometriosis: disease pathophysiology and the role of prostaglandins. *Expert Rev Mol Med.* 2007; 9: 1–20.
8. Laschke MW, Menger MD. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update.* 2007a; 13: 331–42.
9. Podgac S, Abrao MS, Dias JA Jr, Rizzo LV, Oliveira RM, Baracat EC. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod.* 2007; 22: 1373–9. doi: [10.1093/humrep/del16](https://doi.org/10.1093/humrep/del16) PMID: [17234676](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17234676/)
10. Chishima F, Hayakawa S, Sugita K, Kinukawa N, Aleemuzzaman S, Nemoto N, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 in local lesions of endometriosis patients. *Am J Reprod Immunol.* 2002; 48: 50–6. PMID: [12322896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12322896/)
11. Ota H, Igarashi S, Sasaki M, Tanaka T. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod.* 2001; 16: 561–6. PMID: [11228229](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11228229/)
12. Matsuzaki S, Canis M, Pouly JL, Wattiez A, Okamura K, Mage G. Cyclooxygenase-2 expression in deep endometriosis and matched eutopic endometrium. *Fertil Steril.* 2004; 82: 1309–15. doi: [10.1016/j.fertnstert.2004.03.059](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.03.059) PMID: [15533352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15533352/)
13. Ruhland B, Agic A, Krampe J, Diedrich K, Hornung D. Innovations in conservative endometriosis treatment: an updated review. *Minerva Ginecol.* 2011; 63: 247–59. PMID: [21654610](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21654610/)
14. Guo SW, Olive DL. Two unsuccessful clinical trials on endometriosis and a few lessons learned. *Gynecol Obstet Invest.* 2007; 64: 24–35. doi: [10.1159/000098413](https://doi.org/10.1159/000098413) PMID: [17202821](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17202821/)
15. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem.* 2004; 52: 1539–45. doi: [10.1021/jf035189n](https://doi.org/10.1021/jf035189n) PMID: [15030208](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15030208/)
16. Lichtenthaler R, Rodrigues RB, Maia JG, Papagiannopoulos M, Fabricius H, Marx F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits. *Int J Food Sci Nutr.* 2005; 56: 53–64. doi: [10.1080/09637480500082082](https://doi.org/10.1080/09637480500082082) PMID: [16019315](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16019315/)
17. Rodrigues RB, Lichtenthaler R, Zimmermann BF, Papagiannopoulos M, Fabricius H, Marx F, et al. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 2006; 54: 4162–7. doi: [10.1021/jf058169p](https://doi.org/10.1021/jf058169p) PMID: [16756342](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16756342/)
18. Pacheco-Palencia LA, Duncan CE, Talcott ST. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. *Food Chem.* 2009; 115: 1199–205.
19. Kang J, Zhimin L, Wub T, Jensen GS, Schauss AG, Wu X. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chemistry.* 2010; 122: 610–7.
20. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Patel D, Huang D, et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (açai). *J Agric Food Chem.* 2006a; 54: 8598–603. doi: [10.1021/jf060976q](https://doi.org/10.1021/jf060976q) PMID: [17061839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17061839/)
21. Stoner GD. Foodstuffs for preventing cancer: the preclinical and clinical development of berries. *Cancer Prev Res.* 2009; 2: 187–94.
22. de Moura RS, Pires KM, Santos Ferreira T, Lopes AA, Nesi RT, Resende AC, et al. Addition of açai (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. *Food Chem Toxicol.* 2011; 49: 855–63. doi: [10.1016/j.fct.2010.12.007](https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.12.007) PMID: [21147193](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21147193/)
23. Moura RS, Ferreira TS, Lopes AA, Pires KM, Nesi RT, Resende AC, et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine.* 2012; 19: 262–9. doi: [10.1016/j.phymed.2011.11.004](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.11.004) PMID: [22138278](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22138278/)
24. Poulouse SM, Fisher DR, Larson J, Bielinski DF, Rimando AM, Carey AN, et al. Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse

- brain BV-2 microglial cells. *J Agric Food Chem*. 2012; 60: 1084–93. doi: [10.1021/jf203989k](https://doi.org/10.1021/jf203989k) PMID: [22224493](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22224493/)
25. Silva DF, Vidal FC, Santos D, Costa MC, Morgado-Díaz JA, do Desterro MNBS, et al. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. *BMC Complement Altern Med*. 2014; 14: 175. doi: [10.1186/1472-6882-14-175](https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-175) PMID: [24886139](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24886139/)
 26. Sudo RT, Neto ML, Monteiro CE, Amaral RV, Resende AC, Souza PJ, et al. Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract from *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) in a rodent model of acute and neuropathic pain. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 15: 208. doi: [10.1186/s12906-015-0724-2](https://doi.org/10.1186/s12906-015-0724-2) PMID: [26134625](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26134625/)
 27. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, et al. Antioxidant Capacity and Other Bioactivities of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí). *J Agric Food Chem*. 2006b; 54: 8604–10.
 28. Marques ES, Froder JG, Carvalho JCT, Rosa PCP, Perazzo FF, Maistro EL. Evaluation of the genotoxicity of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruit oil (açai), in mammalian cells in vivo. *Food Chem Toxicol*. 2016; 93: 13–19. doi: [10.1016/j.fct.2016.04.018](https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.04.018) PMID: [27125964](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27125964/)
 29. Vernon MW, Wilson EA. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil Steril*. 1985; 44: 684–94. PMID: [4054348](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4054348/)
 30. Perini JA, Angeli-Gamba T, Alessandra-Perini J, Ferreira LC, Nasciutti LE, Machado DE. Topical application of Acheftan on rat skin injury accelerates wound healing: a histopathological, immunohistochemical and biochemical study. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 30: 203.
 31. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrite in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126: 131–8. PMID: [7181105](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7181105/)
 32. Perini JA, Cardoso JV, Berardo PT, Vianna-Jorge R, Nasciutti LE, Bellodi-Priva M, et al. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C>A, -460 T>C, -1154G>A, +405G>C and +936C>T) in endometriosis: a case-control study with Brazilians. *BMC Womens Health*. 2014; 14: 117. doi: [10.1186/1472-6874-14-117](https://doi.org/10.1186/1472-6874-14-117) PMID: [25255852](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25255852/)
 33. Kong S, Zhang YH, Liu CF, Tsui I, Guo Y, Ai BB, et al. The complementary and alternative medicine for endometriosis: a review of utilization and mechanisms. *Evid Based Complement and Alternat Med*. 2014; 2014: 146383.
 34. Tekin YB, Guven S, Kirbas A, Kalkan Y, Tumkaya L, Guvendag Guven ES. Is resveratrol a potential substitute for leuprolide acetate in experimental endometriosis? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2015; 184: 1–6. doi: [10.1016/j.ejogrb.2014.10.041](https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.10.041) PMID: [25462211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25462211/)
 35. da Costa CA, de Oliveira PR, de Bem GF, de Cavalho LC, Ognibene DT, da Silva AF, et al. *Euterpe oleracea* Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2012; 385: 1199–209. doi: [10.1007/s00210-012-0798-z](https://doi.org/10.1007/s00210-012-0798-z) PMID: [23052352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23052352/)
 36. de Souza MO, Souza ESL, de Brito Magalhães CL, de Figueiredo BB, Costa DC, Silva ME, et al. The hypocholesterolemic activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. *Nutr Res*. 2012; 32: 976–84. doi: [10.1016/j.nutres.2012.10.001](https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.10.001) PMID: [23244543](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23244543/)
 37. Rocha AP, Carvalho LC, Sousa MA, Madeira SV, Sousa PJ, Tano T, et al. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascul Pharmacol*. 2007; 46: 97–104. doi: [10.1016/j.vph.2006.08.411](https://doi.org/10.1016/j.vph.2006.08.411) PMID: [17049314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17049314/)
 38. Ergenoglu AM, Yeniel AO, Erbas O, Aktug H, Yildirim N, Ulukus M, et al. Regression of endometrial implants by resveratrol in an experimentally induced endometriosis model in rats. *Reprod Sci*. 2013; 20: 1230–6. doi: [10.1177/1933719113483014](https://doi.org/10.1177/1933719113483014) PMID: [23536571](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23536571/)
 39. Zhang Y, Cao H, Hu YY, Wang H, Zhang CJ. Inhibitory effect of curcumin on angiogenesis in ectopic endometrium of rats with experimental endometriosis. *Int J Mol Med*. 2011; 27: 87–94. doi: [10.3892/ijmm.2010.552](https://doi.org/10.3892/ijmm.2010.552) PMID: [21069258](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21069258/)
 40. Machado DE, Palumbo A Jr, Santos JM, Mattos RM, dos Santos TA, Seabra SH, et al. A GFP endometriosis model reveals important morphological characteristics of the angiogenic process that govern benign and malignant diseases. *Histol Histopathol*. 2014; 29: 903–12. PMID: [24385307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24385307/)
 41. Machado DE, Perini JA, Orlando MM, Santos-Oliveira R. Developing a Noninvasive Procedure Using Labeled Monoclonal Antibody Anti-VEGF (Bevacizumab) for Detection of Endometriosis. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 751460. doi: [10.1155/2015/751460](https://doi.org/10.1155/2015/751460) PMID: [26240826](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26240826/)
 42. Nap AW, Griffioen AW, Dunselmann GA, Bouma-Ter Steege JC, Thijssen VL, Evers JL, et al. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 1089–95. doi: [10.1210/jc.2003-031406](https://doi.org/10.1210/jc.2003-031406) PMID: [15001592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15001592/)
 43. Taylor RN, Mueller MD. Anti-angiogenic treatment of endometriosis: biochemical aspects. *Gynecol Obstet Invest*. 2004; 57: 54–6. PMID: [14974461](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14974461/)

44. Becker CM, D'Amato RJ. Angiogenesis and antiangiogenesis therapy in endometriosis. *Microvasc Res*. 2007; 74: 121–30. doi: [10.1016/j.mvr.2007.04.008](https://doi.org/10.1016/j.mvr.2007.04.008) PMID: [17574280](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17574280/)
45. Laschke MW, Schwender C, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD. Epigallocatechin-3-gallate inhibits estrogen-induced activation of endometrial cells in vitro and causes regression of endometriotic lesions in vivo. *Hum Reprod*. 2008; 23: 2308–18. doi: [10.1093/humrep/den245](https://doi.org/10.1093/humrep/den245) PMID: [18603648](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18603648/)
46. Xu H, Lui WT, Chu CY, Ng PS, Wang CC, Rogers MS. Anti-angiogenic effects of green tea catechin on an experimental endometriosis mouse model. *Hum Reprod*. 2009; 24: 608–18. doi: [10.1093/humrep/den417](https://doi.org/10.1093/humrep/den417) PMID: [19088106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19088106/)
47. Xu H, Becker CM, Lui WT, Chu CY, Davis TN, Kung AL, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits angiogenesis and suppresses vascular endothelial growth factor C/vascular endothelial growth factor receptor 2 expression and signaling in experimental endometriosis in vivo. *Fertil Steril*. 2011; 96: 1021–8. doi: [10.1016/j.fertnstert.2011.07.008](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.07.008) PMID: [21821246](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21821246/)
48. Wang CC, Xu H, Man GC, Zhang T, Chu KO, Chu CY, et al. Prodrug of green tea epigallocatechin-3-gallate (Pro-EGCG) as a potent anti-angiogenesis agent for endometriosis in mice. *Angiogenesis*. 2013; 16: 59–69. doi: [10.1007/s10456-012-9299-4](https://doi.org/10.1007/s10456-012-9299-4) PMID: [22948799](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22948799/)
49. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*. 1992; 13: 18–32. doi: [10.1210/edrv-13-1-18](https://doi.org/10.1210/edrv-13-1-18) PMID: [1372863](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1372863/)
50. Kumar S, Munkarah A, Arabi H, Bandyopadhyay S, Semaan A, Hayek K, et al. Prognostic analysis of ovarian cancer associated with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2011; 204: 63. doi: [10.1016/j.ajog.2010.08.017](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.08.017) PMID: [21074136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21074136/)
51. Mellin A, Sparen P, Persson I, Bergqvist A. Endometriosis and the risk of cancer with special emphasis on ovarian cancer. *Hum Reprod*. 2006; 21: 1237–42. doi: [10.1093/humrep/del462](https://doi.org/10.1093/humrep/del462) PMID: [16431901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16431901/)
52. Becker CM, Beaudry P, Funakoshi T, Benny O, Zaslavsky A, Zurakowski D, et al. Circulating endothelial progenitor cells are up-regulated in a mouse model of endometriosis. *Am J Pathol*. 2011; 178: 1782–91. doi: [10.1016/j.ajpath.2010.12.037](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.037) PMID: [21435458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21435458/)
53. Del Pozo-Infran D, Percival SS, Talcott ST. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. *J Agric Food Chem*. 2006; 54: 1222–9. doi: [10.1021/jf052132n](https://doi.org/10.1021/jf052132n) PMID: [16478240](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16478240/)
54. Fragoso MF, Romualdo GR, Ribeiro DA, Barbisan LF. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol*. 2013; 58: 68–76. doi: [10.1016/j.fct.2013.04.011](https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.04.011) PMID: [23597449](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23597449/)
55. Di Carlo C, Bonifacio M, Tommaselli GA, Bifulco G, Guerra G, Nappi C. Metalloproteinases, vascular endothelial growth factor, and angiotensin 1 and 2 in eutopic and ectopic endometrium. *Fertil Steril*. 2009; 91: 2315–23. doi: [10.1016/j.fertnstert.2008.03.079](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.03.079) PMID: [18644593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18644593/)
56. Machado DE, Berardo PT, Landgraf RG, Fernandes PD, Palmero C, Alves LM, et al. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. *Fertil Steril*. 2010; 93: 2674–9. doi: [10.1016/j.fertnstert.2009.11.037](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.11.037) PMID: [20056215](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20056215/)
57. Swamakar S, Paul S. Curcumin arrests endometriosis by downregulation of matrix metalloproteinase-9 activity. *Indian J Biochem Biophys*. 2009; 46: 59–65. PMID: [19374255](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19374255/)
58. Jana S, Paul S, Swamakar S. Curcumin as anti-endometriotic agent: implication of MMP-3 and intrinsic apoptotic pathway. *Biochem Pharmacol*. 2012; 83: 797–804. doi: [10.1016/j.bcp.2011.12.030](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.12.030) PMID: [22227273](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22227273/)
59. Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, Drexler H, et al. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive species. *Circ Res*. 2003; 92: e80–6. doi: [10.1161/01.RES.0000077044.60138.7C](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000077044.60138.7C) PMID: [12750313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12750313/)
60. Castro MM, Rizzi E, Rodrigues GJ, Ceron CS, Bendhack LM, Gerlach RF, et al. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. *Free Radic Biol Med*. 2009; 46: 1298–307. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.011](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.011) PMID: [19248829](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19248829/)
61. Jackson LW, Schisterman EF, Dey-Rao R, Browne R, Armstrong D. Oxidative stress and endometriosis. *Hum Reprod*. 2005; 20: 2014–20. doi: [10.1093/humrep/del001](https://doi.org/10.1093/humrep/del001) PMID: [15817589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15817589/)
62. Tosti C, Pinzauti S, Santulli P, Chapron C, Petraglia F. Pathogenetic Mechanisms of Deep Infiltrating Endometriosis. *Reprod Sci*. 2015; 22: 1053–9. doi: [10.1177/1933719115592713](https://doi.org/10.1177/1933719115592713) PMID: [26169038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26169038/)
63. Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD. Selective cyclooxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by downregulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. *Fertil Steril*. 2007b; 87: 163–71.

64. Olivares C, Bilotas M, Buquet R, Borghi M, Sueldo C, Tesone M, et al. Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. *Hum Reprod*. 2008; 23: 2701–8. doi: [10.1093/humrep/den315](https://doi.org/10.1093/humrep/den315) PMID: [18716040](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18716040/)
65. Heinrich M, Dhanji T, Casselman I. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) A phytochemical and pharmacological assessment of the species health claims. *Phytochemistry Letters*. 2011; 4: 10–21.
66. Ghosh D, Scheepens A. Vascular action of polyphenols. *Mol Nutr Food Res*. 2009; 53: 322–31. doi: [10.1002/mnfr.200800182](https://doi.org/10.1002/mnfr.200800182) PMID: [19051188](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19051188/)
67. Fang X, Wei J, He X, An P, Wang H, Jiang L, et al. Landscape of dietary factors associated with risk of gastric cancer: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Cancer*. 2015; 51: 2820–32. doi: [10.1016/j.ejca.2015.09.010](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.09.010) PMID: [26589974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26589974/)
68. Zanini S, Marzotto M, Giovinazzo F, Bassi C, Bellavite P. Effects of dietary components on cancer of the digestive system. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015; 55: 1870–85. doi: [10.1080/10408398.2012.732126](https://doi.org/10.1080/10408398.2012.732126) PMID: [24841279](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24841279/)
69. Ribeiro JC, Antunes LM, Aísa AF, Darin JD, De Rosso VV, Mercadante AZ, et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutat Res*. 2010; 695: 22–8. doi: [10.1016/j.mrgentox.2009.10.009](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.10.009) PMID: [19892033](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19892033/)
70. Lin YJ, Lai MD, Lei HY, Wing LYC. Neutrophils and Macrophages Promote Angiogenesis in the Early Stage of Endometriosis in a Mouse Model. *Endocrinology*. 2006; 147(3):1278–1286. doi: [10.1210/en.2005-0790](https://doi.org/10.1210/en.2005-0790) PMID: [16306083](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16306083/)
71. Jeon SH, Chae BC, Kim HA, Seo GY, Seo DW, Chun GT, et al. Mechanisms underlying TGF- β 1-induced expression of VEGF and Flk-1 in mouse macrophages and their implications for angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2007; 81(2):557–66. doi: [10.1189/jlb.0806517](https://doi.org/10.1189/jlb.0806517) PMID: [17053163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17053163/)

6.2 Anticancer potential, molecular mechanisms and toxicity of *Euterpe oleracea* extract (Açaí): A systematic review

Este estudo revisou todos os trabalhos que utilizaram o extrato de *E. oleracea* em modelos experimentais de câncer e/ou avaliaram a segurança/toxicidade do açaí em modelos animais que utilizaram a ordem *Rodentia*. Dos nove estudos incluídos, seis observaram uma capacidade antiproliferativa, anti-inflamatória e antioxidante do açaí em modelo experimental de câncer. Esses estudos sugerem que o açaí possui efeito antitumoral reduzindo a multiplicidade, incidência e tamanho dos tumores. Os três estudos que avaliaram a segurança/toxicidade do açaí em modelo animal observaram ausência de efeitos genotóxicos. Além disso, o açaí foi capaz de reduzir o dano do DNA induzido por quimioterápico, sugerindo um efeito protetor na saúde humana. Este trabalho de revisão teve a finalidade de consolidar e discutir os dados da segurança da utilização do extrato de *E. oleracea* em modelos pré-clínicos saudáveis (*in vivo*) e em modelos experimentais de câncer utilizando roedores.

Anticancer potential, molecular mechanisms and toxicity of *Euterpe oleracea* extract (Açaí): A systematic review.

Short Title: Anticancer potential and toxicity of açaí.

Karina Cristina Rodrigues-Baptista^{1,2¶*}, Jéssica Alessandra-Perini^{2,3¶}, Daniel Escorsim Machado^{2,3,4}, Luiz Eurico Nasciutti³, Jamila Alessandra Perini^{1,2,5}

Affiliations

¹Program of Post-graduation in Public Health and Environment - ENSP, National School of Public Health, Oswald Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

²Research Laboratory of Pharmaceutical Sciences - LAPESF, West Zone State University, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

³Morphological Science Program - PCM, Biomedical Sciences Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

⁴Brazilian Institute of Rehabilitation Medicine - IBMR, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

⁵Research Division, National Institute of Traumatology and Orthopedics - INTO, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

*Corresponding author

E-mail: jessicaperini@yahoo.com.br (JA-P)

¶These authors contributed equally to this work.

Abstract

Cancer is an increasingly frequent malignancy worldwide, and despite the advances in drug development, it is still necessary to develop new plant-derived medicines. *Euterpe oleracea* (açai) is abundant in South and Central America and has health benefits due to its high levels of phytochemicals, including lignans and polyphenols. The aim of this review was to systematically describe the safety and antitumor effects of açai in preclinical models using rodents to provide a more comprehensive assessment of açai for both therapeutic uses and the development of future clinical studies. Eligible studies were identified using four international databases (PubMed, Medline, Lilacs and SciELO) from their inception date through December 2017. The included studies were analyzed with methodological rigor (QATRS) to enable better quality control for these experimental studies. Sixty publications were identified in the databases, but only 9 articles were eligible: 6 evaluated the pharmacological effects of açai in animal models of cancer (1 model each of esophageal cancer, urothelial cancer, melanoma and Walker-256 tumor and 2 models of colon cancer), and 3 were toxicological assays using preclinical models with rodents. Overall, 747 animals were analyzed. On a QATRS score scale of 0–20, the quality of the studies ranged from 16 to 20 points. Pulp was the main fraction of açai administered, and an oral administration route was most common. The açai dosage administered by gavage ranged from 30 mg/kg to 40,000 mg/kg, and açai fed in the diet accounted for 2.5% to 5% of the diet. The anticarcinogenic and chemopreventive activities of açai were observed in all experimental models of cancer and reduced the incidence, tumor cell proliferation, multiplicity and size of the tumors due to the antiinflammatory, antiproliferative and proapoptotic properties of açai. No genotoxic effects were observed after açai administration. The results of this review

suggest that açai is safe and can be used as a chemoprotective agent against cancer development. Açai therapy may be a novel strategy for treating cancer.

Keywords: *Euterpe oleracea*; animal model; cancer; toxicity.

Introduction

The use of natural products as medicines accounts for approximately 30% of the currently available drugs [1], and in some therapeutic areas, the amount of plant-derived medicines reaches 60% [2,3]. Brazil has the greatest amount of biodiversity in the world and plays an important role in the area of natural bioactive compounds by contributing natural products to design new clinical medicines [1,4]. Thus, there has been growing research aimed at establishing the therapeutic potential of natural products against several diseases.

Euterpe oleracea Mart. is a member of the family Arecaceae and is a typical palm of the rainforest in the Amazon region, in the states of the northern region of Brazil, including Guianas, Colombia, Ecuador, and Venezuela [5]. The fruit, popularly known as “açai”, weighs approximately 2 g, and the color of the mature fruit is dark purple [6]. Açai is a traditional food in many regions of Brazil [7,8], and its consumption has increased significantly over the last several years, not only in Brazil but also in Europe and the USA, where the fruit gained popularity after being promoted as a “super fruit” [9]. Currently, due to the health benefits and therapeutic potential of açai, locally grown açai are increasingly exported around the world as energy drinks [6,10], “functional foods” [7,8], cosmetics and pharmaceutical products [9]. Açai pulp is composed of approximately 48% lipids, 13% protein, 8% amino acids, 25% total sugars and minor compounds such as fiber and vitamins (A, B1, B2, B3, C and E) [8,11,12].

Moreover, it is rich in several phytochemicals, including lignans, phenolic compounds (anthocyanins, proanthocyanidins and other flavonoids) and resveratrol, in low concentrations [8,11,12]. The seeds of açai possess the highest concentration of polyphenols (28.3%), followed by the whole fruit (25.5%) and the bark (15.7%) [13].

The pharmacological effects of açai are associated with its chemical composition, particularly the presence of bioactive substances, such as phenolics, flavonoids and anthocyanins [14-16]. To date, açai has been shown to have pharmacological properties including antiinflammatory, antioxidant, cardioprotective and anticancer activities [1,7-9,17]. Furthermore, açai was not shown to be genotoxic *in vitro* and *in vivo* studies conducted, in cultured human lymphocytes and hepatoma cell lines [18], in rodents [19] and in humans [20].

The aim of this review was to systematically describe the safety and antitumor effects of açai in preclinical models using rodents, to provide a comprehensive assessment of açai for therapeutic use. Preclinical studies using rodents were evaluated to investigate whether the current knowledge supports clinical trials with açai.

Methods

Search strategy

A careful literature search was performed to identify publications that studied the use of *E. oleracea* extract in experimental animal models of cancer and/or evaluated the safety/toxicity of açai in animal models. Studies were identified by searching the electronic databases: PubMed, Medline-Bireme, Lilacs and SciELO from their inception date through December 2017 (S1 Table). The search terms were as follows: (“*Euterpe oleracea*” AND cancer treatment) OR (“*Euterpe oleracea*” AND cancer animal model)

OR (Açaí AND cancer treatment) OR (Açaí AND cancer animal model) AND (“*Euterpe oleracea*” AND toxicity) OR (Açaí AND toxicity). The search was performed without restrictions on the language or year of publication. Two reviewers (KCRB and JA-P) selected the qualified studies independently by browsing the titles, abstracts or full texts based on the eligibility criteria. The duplicates were removed. The eligible articles were separated for analysis of the study methodology and results (S1 Table). Any disagreements were resolved by discussion with two additional reviewers (DEM and JAP).

Inclusion and exclusion criteria

Articles were included if the following criteria were met: (1) evaluated the pharmacological effect of açaí in animal models of cancer and/or (2) performed toxicological analyzes after açaí administration in experimental animal models. Articles were excluded if the following criteria were met: (1) were reviews of literature; (2) did not analyze the use of açaí *in vivo*; (3) did not use the order *Rodentia*; (4) did not evaluate the toxicological effects of açaí administration *in vivo*; and (5) used only *in vitro* experimental models.

Data extraction

Three investigators (KCRB, JA-P and JAP) independently conducted the extraction of details from each study including the following: (1) basic information, including the publication year, the first author's name, the type of animals, the sex, the *in vivo* model and the experimental interventions; (2) basic information about the açaí treatment, including the fraction and origin of *E. oleracea*, dose, administration route, posology, diluents and treatment groups; and (3) outcome measures used to evaluate *E.*

oleracea extract, therapeutic indications (pharmacodynamic), açáí signaling pathways and safety evaluations. When a single publication included studies with animals, posology or types of interventions that were different, these data were extracted and considered as independent experiments. Any disagreements regarding the extracted data were resolved by discussion with an additional reviewer (DEM).

Quality assessment

For assessment of quality, two independent reviewers (KCRB and JA-P) used a quality rating scale as an animal/tissue research scale (QATRS). The QATRS is a 20-point scaled evaluation chart that was designed based on randomization, blinding, the similarity of the animal/tissue model to human applications, standardization and the reliability of the measurement techniques, management of study withdrawals, and appropriateness of the statistical methods [21]. Any disagreements were resolved by discussion with two additional reviewers (DEM and JAP).

Results

Study selection

A flowchart of the articles that were included in the review is illustrated in Fig. 1. A total of 60 publications were identified in the databases; however, 31 were duplicate articles. Among the 29 articles selected, 20 were excluded based on the titles and abstracts because they did not meet the inclusion criteria: 2 were literature reviews [7,22]; 6 did not study açáí in an animal model of cancer and/or did not perform a toxicological analysis [23-28]; 10 were *in vitro* studies [13,18,29-36]; and 2 did not use the order *Rodentia* [19,37]. After reading the full texts 9 articles were included for their

critical evaluations of the safety and effectiveness of açai in animal experimental models [38-46].

Fig 1. Flowchart of the study selection and inclusion in the review.

Characteristics of the experimental models

The articles included were analyzed with a critical appraisal tool (QATRS), which allowed for improved quality control of the experimental studies in animal performed independently (see methods). QATRS scores ranged from 0 to 20, and the quality of the studies ranged from 16 to 20 points (Table 1). Among the 9 studies that were included, 6 evaluated the pharmacological effects of açai in experimental models of cancer, including esophageal [38], urothelial [39], and colon cancer [40,41], and melanoma [42] and Walker-256 tumors [43], and 3 performed toxicological analyses of açai in experimental models [44-46]. For the interventions used in the experimental models, 4 studies used chemically induced cancer models [38-41], 2 used inoculation of tumor cells [42,43], and 3 used models with DNA damage induced by a chemotherapeutic agent [44-46]. The studies involved 2 species and 6 varieties of rodents: C57BL/6 mice [42], F344 rats [38], Wistar rats [40,43,45,46], Swiss mice [39,44], ICR mice [41] and Balb/c mice [46] (Table 1).

Açaí information

Table 2 shows the basic information about the açaí extract used in the experimental models. The most commonly used açaí fraction was the pulp [38-41,44], followed by the juice [46], oil [42,45] and seeds [43]. Eight studies mentioned the açaí origin, and all of the açaí extracts were from Brazil [38-41,43-45]. The main administration route of açaí was oral; 4 studies administered açaí by gavage [43-46], and 4 studies administered açaí as part of the diet [38-41]. The dosage ranged from 30 mg/kg to 40,000 mg/kg in studies that administered açaí by gavage and was administered as a single dose or as 1 daily dose for 90 consecutive days; in the studies that administered açaí as part of the diet 2.5% to 5% açaí supplementation was provided in the diet for 10 to 35 weeks (Table 2). In addition, Schauss and colleagues used oral and intraperitoneal administration of açaí at a dose of 0.1mg/0.15mL (daily dose during 7 consecutive days) to assess the possible genotoxic effects of açaí using BALB/c mice [46], and Monge-Fuentes and colleagues used 50 mg/mL of açaí administered intratumorally in an experimental model of melanoma [42]. The results regarding the therapeutic indications, effects and safety of açaí in experimental models are summarized in Table 3.

Safety of açai

The absence of toxicity of açai was reported in 6 studies after testing açai in experimental models [39,40,42,44-46], and no significant differences in animal body weight or food consumption were reported in 4 studies [38-40,46]. DNA damage induced by antitumor medication was evaluated in 3 studies, and no genotoxic effects were observed after açai administration by gavage [44-46] (Table 3).

Using a micronucleus test and a comet assay, Ribeiro and colleagues reported no differences between the control and açai groups in bone marrow and peripheral blood cells polychromatic erythrocytes, and in liver and kidney cells, thus demonstrating the absence of genotoxic effects of açai. In addition, açai reduced DNA damage induced by doxorubicin (DXR), suggesting a protective role in human health [44]. In a study done by Schauss and colleagues, açai did not cause mutagenic effects, as demonstrated by a bacterial reverse mutation assay, a chromosomal aberration assay, a mammalian cell mutation assay and an *in vivo* micronucleus study [46]. In the same way, Marques and colleagues evaluated the genotoxic potential of açai in rat cells. The authors used a comet assay and a micronucleus test and showed that on both cytogenetic tests, no significant genotoxic effects were observed at the three tested dosages of açai [45].

Antitumoral effects of açai

The anticarcinogenic and chemopreventive activities of açai, as evidenced by reductions in the incidence of tumors, tumor cell proliferation, and multiplicity and size of tumors, were observed in all the experimental models of cancer [38-43] (Table 3).

Stoner and colleagues reported that açai was effective at inhibiting the progression of esophageal tumorigenesis, reducing the levels of the serum cytokines

(IL-5 and IL-8), and increasing serum antioxidant capacity and interferon-gamma (IFN γ) levels [38]. By contrast, the esophageal tumor size and serum levels of IL-1 β , IL-4, IL-13 and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) were not significantly affected by adding açai to the diet for 35 weeks [38].

Fragoso and colleagues reported that açai was effective at inhibiting urinary bladder carcinogenesis, reducing DNA damage, and reducing the expression of p63 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) [39]. However, altered cytoplasmic and nuclear β -catenin were not significantly affected by adding açai to the diet for 10 weeks [39].

Two studies reported that açai was effective at inhibiting colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in Wistar rats [40] and azoxymethane (AOM) with dextran sulfate sodium (DSS) in ICR mice [41]. Nevertheless, the opposite results were observed with regard to cleaved caspase-3 expression after supplementation with 2.5% and 5% of açai in the diet for 10 [40], 14 [41] or 20 weeks [40]. Despite the discrepancies between these studies, the quality evaluation of the results of the articles showed good quality QATRS (16/20 and 20/20, respectively) [40,41]. Moreover, Choi and colleagues reported that açai treatment down-regulated myeloperoxidase (MPO) and proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6), inhibited cyclooxygenase 2 (COX-2), PCNA and Bcl-2, and increased Bad and cleaved caspase-3 expression in an experimental model of cancer colon [41].

Monge-Fuentes and colleagues reported that açai was an effective photosensitizer because it reduced melanoma carcinogenesis by increasing the necrotic tissue per tumor area after 5 applications of intratumoral açai during a period of 15 days [42].

Nascimento and colleagues reported an anticarcinogenic effect (tumor diameter

and weight) of açai in anorexia-cachexia syndrome induced by Walker-256 tumors due to the antioxidant activity of açai after 1 daily dose of açai over 14 consecutive days [43].

Finally, based on the results of this review study, we created a schematic representation of the effects of açai in tumor cells (Fig. 2). Açai showed antitumoral functions due to its antiinflammatory, antiproliferative and proapoptotic properties.

Discussion

Research on the pharmacological effects of natural products for the treatment of several diseases has significantly increased in the last decades. In this sense, açai has been marketed as a dietary food supplement because of its health benefits due to its high levels of phytochemicals, including lignans and polyphenols. Studies have demonstrated that açai has biological effects, such as antioxidant, antiinflammatory, antiproliferative, antinociceptive and antitumorigenic activities [13,16,47-53].

As far as we know, the present work is the first review to focus on the antitumorigenic and toxicological effects of açai in preclinical trials using rodents. Overall, nine studies were included in this review [38-46]. Although we conducted a thorough literature search, using four international databases, one limitation is that our conclusions may be narrow due to the lack of availability of published articles and because all of the included studies were published in English. In spite of the small number of studies found, we assessed them with a range of methodological rigor in accordance with the QATRS, which encompasses various aspects that enable better quality control for these experimental studies [21]. A strong point of our review is that all the included studies had good quality as assessed by the QATRS score (all had a score greater than or equal to 16/20). A total of 747 animals of the order *Rodentia* were

analyzed. The results indicated that açai has a chemopreventive effect (anticancer) by inhibiting tumor growth and leads to a reduction in tumor size, suggesting antiproliferative, pro-apoptotic and antiinflammatory activity [38-43]. In addition, the toxicological studies showed that açai did not cause DNA damage or genotoxic or mutagenic effects in the evaluated animals, suggesting that it is safe for clinical testing [44-46].

Most of the studies found that açai significantly decreased tumor incidence or tumorigenic inhibition and prevented DNA damage without causing genotoxic effects when it was administered orally (in the diet or by gavage). These results suggest that the oral route is a good choice for evaluation of the effects of açai in humans clinical studies since this is an easy and safe route of administration. It should be noted that the significant results found with the oral administration of açai have also been described in other diseases, such as obesity and hepatic steatosis [54], endometriosis [53], renovascular hypertension [55] and neuropathic pain [51]. The articles included in this review described different doses of açai that were administered orally by gavage (range 30 mg/kg to 40,000 mg/kg) [43-46]. However, Marques and colleagues observed that at an açai dose of 300 mg/kg, a few animals showed signs of toxicity (diarrhea and bristling of the hair), which is why they did not test higher doses [45]. Recently, our group reported that a dose of açai of 200 mg/kg administered by gavage for 30 consecutive days had efficacy in suppressing endometriotic lesions in a Sprague-Dawley rat model without any signs of toxicity [53]. Although considered a benign disease, endometriosis frequently presents with characteristics of malignancy [56]. Therefore, we suggest that an açai dose of 200 mg/kg is safe for preclinical testing and is a promising novel pharmacological treatment for cancer due to its anticarcinogenic and chemopreventive effects.

With regard to the ability of açai to inhibit carcinogenesis, and the incidence and multiplicity of tumors in experimental models of cancer using rodents, *in vitro* studies also showed that açai decreased cell viability, suppressed proliferation and induced apoptosis, suggesting the anticancer and antioxidant activity of açai against C-6 rat brain glioma cells [47], MCF-7 breast cancer cells [13,36] and colon cancer cells [32]. These results suggest that açai contains phytochemicals that can be used as natural chemopreventive agents [13,38,40].

A large number of studies have shown the importance of chronic exposure to proinflammatory cytokines in tumorigenesis [57-59]. The results of this review show that açai acts in the inflammatory processes involved in induced-cancer in animals by decreasing the levels of IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-8, COX-2, TNF- α and MPO and increasing the levels of IFN- γ [38,41]. An *in vitro* study of polymorphonuclear cells showed a reduction in the IL-8 levels that was associated with the decreasing inflammatory conditions after açai treatment [60]. Xie and colleagues evaluated flavonoids isolated from açai pulp and observed a reduction in serum levels, gene expression and protein levels of both the cytokines TNF- α and IL-6 in the resident macrophages cells [61]. Açai was also able to prevent increases in the levels of IL-1 β and TNF- α in the brain tissues of a CCl₄ experimental model [25]. In addition, açai reduced the COX-2 expression and PGE₂ levels in an experimental model of endometriosis [53] and reduced the MPO levels in a rat renal ischemia/reperfusion model [62].

As a result of this review, it was possible to identify the antiproliferative pathways by which açai acts by reducing PCNA, Ki-67 and p63 [39-41]. These proteins are involved in tumor development, survival and metastasis of different tumors [63-65]. In addition, the anti-apoptotic proteins Bcl-2 was also reduced after açai treatment in

animals with induced-cancer [41], in agreement with a study of human colon cancer cells in which the proapoptotic activities of polyphenolics from açai were described [32]. Polyphenolics may regulate distinct steps of the apoptotic process and/or the expression of regulatory proteins, such as the downregulation of Bcl-2 and cleavage of caspase-3 [66,67]. Açai polyphenolics were previously described to have proapoptotic and antiproliferative activities in leukemia cancer cells through caspase-3 activation [68]. Surprisingly, as a result of this review, it was possible to identify the discrepancies in the levels of cleaved caspase-3 in colon carcinogenesis induced after açai treatment [39,41]. Choi and colleagues observed that açai increased the cleaved caspase-3 levels in the supernatants of colon strips [41], but Fragoso and colleagues described the opposite results using immunohistochemical techniques in colon tumor tissues [39].

Toxicity data are decisive for evaluating the safety of natural products for clinical treatment because these data investigate the potential for mutagenicity, genotoxicity, clastogenicity and aneugenicity [69]. The toxicological studies included in this review showed that açai is non-toxic [40,42,44-46], has no genotoxic or mutagenic effects, and has a protective effect on DNA damage caused by antitumoral agents [44-46]. Similarly, Santos and colleagues showed that antioxidant compounds prevented the induction of DNA damage induced by DXR [70]. On the other hand, açai showed mutagenic effects when assayed in high concentrations in eukaryotic cells of *Saccharomyces cerevisiae* yeast; however, there is a low mutagenic risk for humans because the tested concentrations were significantly elevated [29]. Since only 3 studies investigated the genetic toxicity of açai in preclinical trials of rodents [44-46], future research is needed to better understand the efficacy of açai because its antimutagenic and antioxidant activities may prevent DNA damage and thus improve human health.

Conclusions

The results of this review suggest that açaí is safe and can be used as a chemoprotective agent against cancer by exhibiting antiinflammatory, antioxidant, antiproliferative, and proapoptotic properties. Further studies on the functional relevance of açaí are necessary to build a database that can be used in future clinical investigations aimed at discovering antitumor agents.

Acknowledgments

The authors thank the support of Dr. Roberto Soares de Moura due important intellectual discussion about açaí.

References

1. Dutra RC, Campos MM, Santos AR, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res.* 2016;112:4-29. doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.021.
2. Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem.* 2011;46(10):4769-807. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.07.057.
3. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 2012;75(3):311-35. doi: 10.1021/np200906s.
4. Valli M, dos Santos RN, Figueira LD, Nakajima CH, Castro-Gamboa I, Andricopulo AD, et al. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. *J Nat Prod.*2013;76(3):439-44. doi: 10.1021/np3006875.

5. E Souza BSF, Carvalho HO, Ferreira IM, da Cunha EL, Barros AS, Taglialegna T, et al. Effect of the treatment with *Euterpe oleracea* Mart. oil in rats with Triton-induced dyslipidemia. *Biomed pharmacother.* 2017;90:542-7. doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.005.
6. de Sousa MO, Souza e Silva L, de Brito Magalhães CL, de Figueiredo BB, Costa DC, Silva ME, et al. The hypocholesterolemic activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. *Nutr Res.* 2012;32(12):976-84. doi: 10.1016/j.nutres.2012.10.001.
7. Kinghorn AD, Chai HB, Sung CK, Keller WJ. The classical drug discovery approach to defining bioactive constituents of botanicals. *Fitoterapia.* 2011;82(1):71-9. doi: 10.1016/j.fitote.2010.08.015.
8. Ulbricht C, Brigham A, Burke D, Costa D, Giese N, Iovin R, et al. An evidence-based systematic review of açai (*Euterpe oleracea*) by the natural standard research collaboration. *J Diet Suppl.* 2012;9(2):128-47. doi: 10.3109/19390211.2012.686347.
9. de Moura RS, Resende ÂC. Cardiovascular and metabolic effects of açai, an amazon plant. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2016;68(1):19-26. doi: 10.1097/FJC.0000000000000347.
10. Yamaguchi KK, Pereira LF, Lamarão CV, Lima ES, da Veiga-Junior VF. Amazon açai: Chemistry and biological activities: A review. *Food Chem.* 2015;179:137-51. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.055.
11. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried amazonian palm berry,

Euterpe oleracea Mart. (Açaí). J Agric Food Chem. 2006;54(22):8604-10. doi: 10.1021/jf0609779.

12. Heinrich M, Dhanji T, Casselman I. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) — A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. Phytochemistry Letters. 2011;4(1):10-21. doi: 10.1016/j.phytol.2010.11.005.

13. Silva DF, Vidal FC, Santos D, Costa MC, Morgado-Díaz JA, do Desterro Soares Brandão Nascimento M, et al. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. BMC Complement Altern Med. 2014;14:175. doi: 10.1186/1472-6882-14-175.

14. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). J Agric Food Chem. 2004;52(6):1539-45. doi: 10.1021/jf035189n.

15. Rodrigues RB, Lichtenthaler R, Zimmermann BF, Papagionnopoulos M, Fabricius H, Marx F, et al. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) seeds and identification of their polyphenolic compounds. J Agric Food Chem. 2006;54(12):4162-7. doi: 10.1021/jf058169p.

16. Moura RS, Ferreira TS, Lopes AA, Pires KM, Nesi RT, Resende AC, et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. Phytomedicine. 2012;19(3-4):262-9. doi: 10.1016/j.phymed.2011.11.004.

17. Sadowska-Krepa E, Klapcinska B, Podgórski T, Szade B, Tyl K, Hadzik A. Effects of supplementation with açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) berry-based juice blend on the blood antioxidant defence capacity and lipid profile in junior hurdlers. A pilot study. Biol Sport. 2015;32(2):161-8. doi: 10.5604/20831862.1144419.

18. Marques ES, Tsuboy MSF, Carvalho JCT, Rosa PCP, Perazzo FF, Gaivão IOM, et al. First cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic assessment of *Euterpe oleracea* fruit oil (açai) in cultured human cells. *Genet Mol Res.* 2017;16(3). doi: 10.4238/gmr16039700.
19. Caiado RR, Peris CS, Lima-Filho AAS, Urushima JGP, Novais E, Badaró E, et al. Retinal toxicity of açai fruit (*Euterpe Oleracea*) dye concentrations in rabbits: Basic principles of a new dye for chromovitrectomy in humans. *Curr Eye Res.* 2017;42(8):1185-93. doi: 10.1080/02713683.2017.1297995.
20. Udani JK, Singh BB, Singh VJ, Barrett ML. Effects of açai (*Euterpe oleracea Mart.*) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: a pilot study. *Nutr J.* 2011;10:45. doi: 10.1186/1475-2891-10-45.
21. Bashardoust Tajali S, Macdermid JC, Houghton P, Grewal R. Effects of low power laser irradiation on bone healing in animals: a meta-analysis. *J Orthop Surg Res.* 2010;5(1):1. doi: 10.1186/1749-799X-5-1.
22. Schreckinger ME, Lotton J, Lila MA, de Mejia EG. Berries from South America: a comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. *J Med Food.* 2010;13(2):233-46. doi: 10.1089/jmf.2009.0233.
23. Felzenszwalb I, da Costa Marques MR, Mazzei JL, Aiub CA. Toxicological evaluation of *Euterpe edulis*: a potential superfruit to be considered. *Food Chem Toxicol.* 2013;58:536-44. doi: 10.1016/j.fct.2013.05.029.
24. Kim YS, Jung H, Zerín T, Song HY. Protein profiling of paraquat-exposed rat lungs following treatment with açai (*Euterpe oleracea Mart.*) berry extract. *Mol Med Rep.* 2013;7(3):881-6. doi: 10.3892/mmr.2013.1259.
25. de Souza Machado F, Kuo J, Wohlenberg MF, da Rocha Frusciante M, Freitas M, Oliveira AS, et al. Subchronic treatment with açai frozen pulp prevents the

brain oxidative damage in rats with acute liver failure. *Metab Brain Dis.* 2016;31(6):1427-34. doi: 10.1007/s11011-016-9873-3.

26. Kowar M, Friedrich C, Jacobs AH. [Pregabalin as a rare cause of liver disease]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2015;140(23):1759-60. doi: 10.1055/s-0041-105987.

27. Leba LJ, Brunschwig C, Saout M, Martial K, Bereau D, Robinson JC. *Oenocarpus bacaba* and *Oenocarpus bataua* leaflets and roots: A new source of antioxidant compounds. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7). doi: 10.3390/ijms17071014.

28. Brasil A, Rocha FAF, Gomes BD, Oliveira KRM, de Carvalho TS, Batista EJO, et al. Diet enriched with the Amazon fruit açai (*Euterpe oleracea*) prevents electrophysiological deficits and oxidative stress induced by methyl-mercury in the rat retina. *Nutr Neurosci.* 2017;20(5):265-72. doi: 10.1080/1028415X.2015.1119378.

29. Spada PD, de Souza GG, Bortolini GV, Henriques JA, Salvador M. Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits. *J Med Food.* 2008;11(1):144-51. doi: 10.1089/jmf.2007.598.

30. Silva D. Analysis of cytotoxicity of fruit extract juçara (*Euterpe oleracea* Mart) of Maranhão in human malignant cells. Tese. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2013.

31. Wong DY, Musgrave IF, Harvey BS, Smid SD. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry extract exerts neuroprotective effects against β -amyloid exposure in vitro. *Neurosci Lett.* 2013;556:221-6. doi: 10.1016/j.neulet.2013.10.027.

32. Dias MM, Noratto G, Martino HS, Arbizu S, Peluzio M do C, Talcott S, et al. Pro-apoptotic activities of polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Martius) in human SW-480 colon cancer cells. *Nutr Cancer.* 2014;66(8):1394-405. doi: 10.1080/01635581.2014.956252.

33. Brito C, Stavroullakis AT, Ferreira AC, Li K, Oliveira T, Nogueira-Filho G, et al. Extract of açai-berry inhibits osteoclast differentiation and activity. *Arch Oral Biol*. 2016;68:29-34. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.03.016.
34. Machado AK, Andrezza AC, da Silva TM, Boligon AA, do Nascimento V, Scola G, et al. Neuroprotective effects of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) against rotenone *in vitro* exposure. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8940850. doi: 10.1155/2016/8940850.
35. Brito C, Stavroullakis A, Oliveira T, Prakki A. Cytotoxicity and potential anti-inflammatory activity of velutin on RAW 264.7 cell line differentiation: Implications in periodontal bone loss. *Arch Oral Biol*. 2017;83:348-56. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.09.001.
36. Freitas DDS, Morgado-Díaz JA, Gehren AS, Vidal FCB, Fernandes RMT, Romão W, et al. Cytotoxic analysis and chemical characterization of fractions of the hydroalcoholic extract of the *Euterpe oleracea* Mart. seed in the MCF-7 cell line. *J Pharm Pharmacol*. 2017;69(6):714-21. doi: 10.1111/jphp.12679.
37. Vrailas-Mortimer A, Gomez R, Dowse H, Sanyal S. A survey of the protective effects of some commercially available antioxidant supplements in genetically and chemically induced models of oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol*. 2012;47(9):712-22. doi: 10.1016/j.exger.2012.06.016.
38. Stoner GD, Wang LS, Seguin C, Rocha C, Stoner K, Chiu S, et al. Multiple berry types prevent N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats. *Pharm Res*. 2010;27(6):1138-45. doi: 10.1007/s11095-010-0102-1.
39. Fragoso MF, Prado MG, Barbosa L, Rocha NS, Barbisan LF. Inhibition of mouse urinary bladder carcinogenesis by açai fruit (*Euterpe oleraceae* Martius) intake. *Plant Foods Hum Nutr*. 2012;67(3):235-41. doi: 10.1007/s11130-012-0308-y.

40. Fragoso MF, Romualdo GR, Ribeiro DA, Barbisan LF. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol.* 2013;58:68-76. doi: 10.1016/j.fct.2013.04.011.
41. Choi YJ, Choi YJ, Kim N, Nam RH, Lee S, Lee HS, et al. Açai berries inhibit colon tumorigenesis in azoxymethane/dextran sulfate sodium-treated mice. *Gut Liver.* 2017;11(2):243-52. doi: 10.5009/gnl16068.
42. Monge-Fuentes V, Muehlmann LA, Longo JP, Silva JR, Fascineli ML, de Souza P, et al. Photodynamic therapy mediated by açai oil (*Euterpe oleracea Martius*) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. *J Photochem Photobiol.* 2017;166:301-10. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.12.002.
43. Nascimento VH, Lima CD, Paixão JT, Freitas JJ, Kietzer KS. Antioxidant effects of açai seed (*Euterpe oleracea*) in anorexia-cachexia syndrome induced by Walker-256 tumor. *Acta Cir Bras.* 2016;31(9):597-601. doi: 10.1590/S0102-865020160090000004.
44. Ribeiro JC, Antunes LM, Aissa AF, Darin JD, de Rosso VV, Mercadante AZ, et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutat Res.* 2010;695(1-2):22-8. doi: 10.1016/j.mrgentox.2009.10.009.
45. Marques ES, Froder JG, Carvalho JC, Rosa PC, Perazzo FF, Maistro EL. Evaluation of the genotoxicity of *Euterpe oleraceae* Mart. (Arecaceae) fruit oil (açai), in mammalian cells in vivo. *Food Chem Toxicol.* 2016;93:13-9. doi: 10.1016/j.fct.2016.04.018.

46. Schauss AG, Clewell A, Balogh L, Szakonyi IP, Financsek I, Horváth J, et al. Safety evaluation of an açai-fortified fruit and berry functional juice beverage (MonaVie Active((R))). *Toxicology*. 2010;278(1):46-54. doi: 10.1016/j.tox.2010.04.017.
47. Hogan S, Chung H, Zhang L, Li J, Lee Y, Dai Y, et al. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. *Food Chem* 2010;118(2):208-14. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.099.
48. Matheus ME, Oliveira SBF, Silveira CS, Rodrigues VP, de Souza Menezes F, Fernandes PD. Inhibitory effects of *Euterpe oleraceae* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. *J Ethnopharmacol*. 2006;107(2):291-6. doi: 10.1016/j.jep.2006.03.010.
49. Schauss AG, Wu , Prior RL, Ou B, et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe Oleraceae* Mart. (Açai). *J Agric Food Chem*. 2006;54(22):8598-603. doi: 10.1021/jf060976g.
50. de Moura RS, Pires KM, Santos Ferreira T, Lopes AA, Nesi RT, Resende AC, et al. Addition of açai (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(4):855-63. doi: 10.1016/j.fct.2010.12.007.
51. Sudo RT, Neto ML, Monteiro CE, Amaral RV, Resende ÂC, Souza PJ, et al. Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract from *Euterpe oleracea* Mart. (Açai) in a rodent model of acute and neuropathic pain. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15(208). doi: 10.1186/s12906-015-0724-2.
52. Poulouse SM, Fischer DR, Larson J, Bielinski DF, Rimando AM, Carey AN, et al. Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. *J Agric Food Chem*. 2012;60(4):1084-93. doi: 10.1021/jf203989k.

53. Machado DE, Rodrigues-Baptista KC, Alessandra-Perini J, Soares de Moura R, Santos TA, Pereira KG, et al. *Euterpe Oleracea* extract (Açaí) is a promising novel pharmacological therapeutic treatment for experimental endometriosis. PLoS One. 2016;11(11):e0166059. doi: 10.1371/journal.pone.0166059.
54. de Oliveira PR, da Costa CA, de Bem GF, Cordeiro VS, Santos IB, de Carvalho LC, et al. *Euterpe oleracea* Mart.-derived polyphenols protect mice from diet-induced obesity and fatty liver by regulating hepatic lipogenesis and cholesterol excretion. PLoS One. 2015;10(12):e0143721. doi: 10.1371/journal.pone.0143721.
55. da Costa CA, Ognibene DT, Cordeiro VSC, de Bem GF, Santos IB, Soares RA, et al. Effect of *Euterpe oleracea* Mart. seeds extract on chronic ischemic renal injury in renovascular hypertensive rats. J Med Food. 2017;20(10):1002-10. doi: 10.1089/jmf.2017.0011.
56. Machado DE, Palumbo AJ, Santos JM, Mattos RM, dos Santos TA, Seabra SH, et al. A GFP endometriosis model reveals important morphological characteristics of the angiogenic process that govern benign and malignant diseases. Histol Histopathol. 2014;29(7):903-12. doi: 10.14670/HH-29.903.
57. Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr C, Wirtz S, Nikolaev A, et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. Immunity. 2004;21(4):491-501. doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.020.
58. Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S, et al. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. J Clin Invest. 2008;118(2):560-70. doi: 10.1172/JCI32453.
59. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and

development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*. 2009;15(2):103-13. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.001.

60. Jensen GS, Wu X, Patterson KM, Barnes J, Carter SG, Scherwitz L, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study. *J Agric Food Chem*. 2008;56(18):8326-33. doi: 10.1021/jf8016157.

61. Xie C, Kang J, Li Z, Schauss AG, Badger TM, Nagarajan S, et al. The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway. *J Nutr Biochem*. 2012;23(9):1184-91. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.06.013.

62. El Morsy EM, Ahmed MA, Ahmed AA. Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by açai extract preconditioning in a rat model. *Life Sci*. 2015;123:123-35. doi: 10.1016/j.lfs.2014.11.013.

63. Guzinska-Ustymowicz K, Pryczynicz A, Kemonia A, Czyzewska J. Correlation between proliferation markers: PCNA, Ki-67, MCM-2 and antiapoptotic protein Bcl-2 in colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2009;29(8):3049-52.

64. Graziano V, de Laurenzi V. Role of p63 in cancer development. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1816(1):57-66. doi: 10.1016/j.bbcan.2011.04.002.

65. Qiu X, Mei J, Yin J, Wang H, Wang J, Xie M. Correlation analysis between expression of PCNA, Ki-67 and COX-2 and X-ray features in mammography in breast cancer. *Oncol Lett*. 2017;14(3):2912-8. doi: 10.3892/ol.2017.6516.

66. Roy AM, Baliga MS, Katiyar SK. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells via modulation in

protein expression of p53 and Bax and caspase-3 activation. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(1):81-90.

67. Forester SC, Gu Y, Lambert JD. Inhibition of starch digestion by the green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Mol Nutr Food Res.* 2012;56(11):1647-54. doi: 10.1002/mnfr.201200206.

68. Del Pozo-Insfran D, Percival SS, Talcott ST. Açai (*Euterpe Oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. *J Agric Food Chem.* 2006;54(4):1222-9. doi: 10.1021/jf052132n.

69. Rim KT, KIM SJ. A review on mutagenicity testing for hazard classification of chemicals at work: focusing on *in vivo* micronucleus test for allyl chloride. *Saf Health Work.* 2015;6(3):184-91. doi: 10.1016/j.shaw.2015.05.005.

70. Santos RA, Takahashi CS. Anticlastogenic and antigenotoxic effects of selenomethionine on doxorubicin-induced damage *in vitro* in human lymphocytes. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(2):671-7. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.090.

Supporting information

S1 Table. Complete search on açai in databases.

S2 Table. PRISMA checklist.

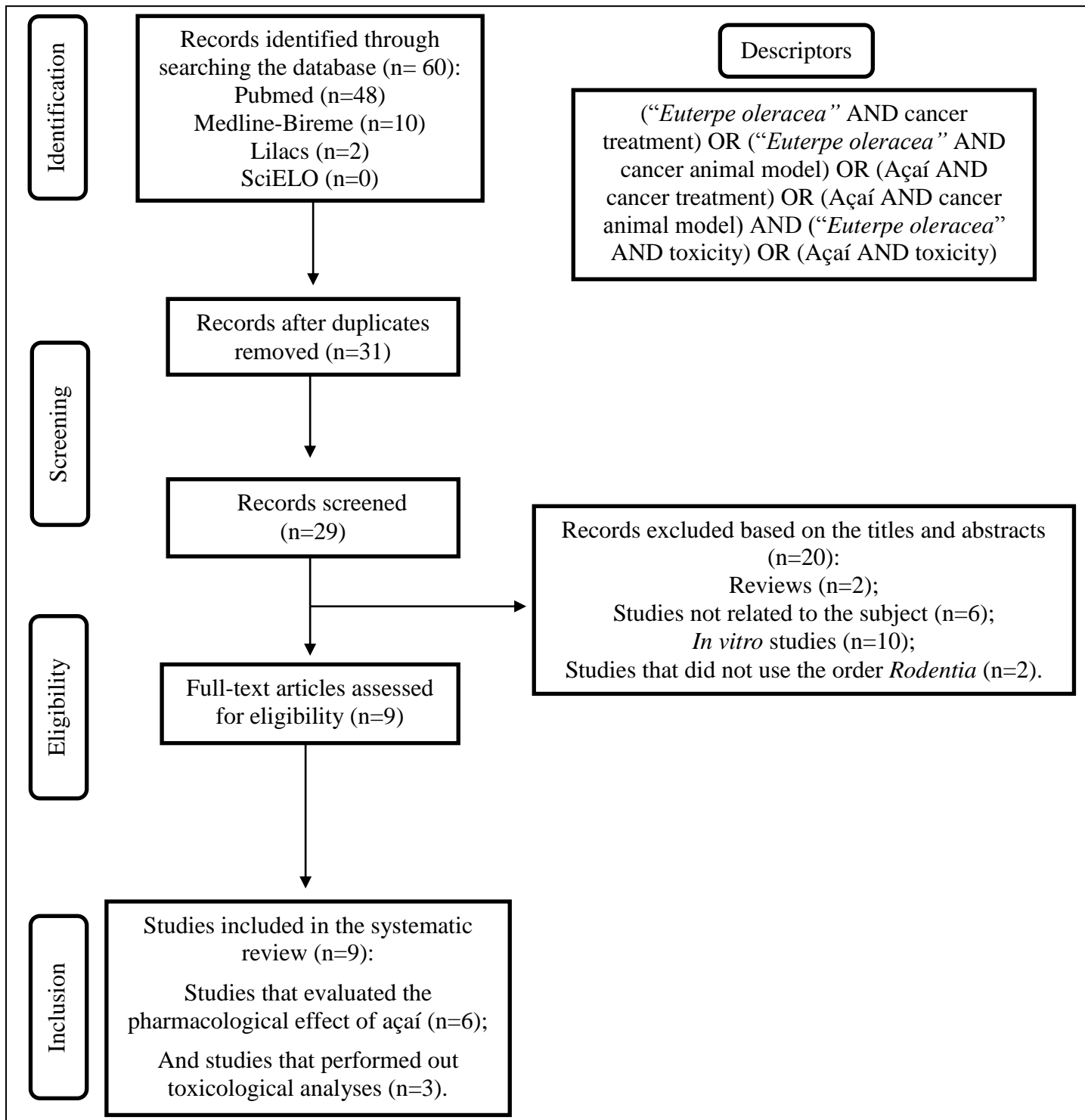


Fig. 1 Flowchart of study selection and inclusion in the review.

Table 1. Basic information on the *in vivo* experimental models used to test the effects of *E. oleracea*.

Model	Animals	Interventions	References^a	QATRS
Cancer	Male F344 rats	Esophageal carcinogenesis induced by NMBA	Stoner <i>et al.</i> 2010	16
	Male Swiss mice	Urothelial carcinogenesis induced by BBN and MNU	Fragoso <i>et al.</i> 2012	20
	Male Wistar rats	Colon carcinogenesis induced by DMH	Fragoso <i>et al.</i> 2013	20
	Male Wistar rats	Anorexia-cachexia syndrome induced by Walker-256 tumor	Nascimento <i>et al.</i> 2016	16
	Male ICR mice	Colon carcinogenesis induced by AOM and DSS	Choi <i>et al.</i> 2017	16
	Female C57BL/6 mice	Melanoma induced by transplantation of B16F10 cells	Monge-Fuentes <i>et al.</i> 2017	18
Toxicity	Male Swiss mice	DNA damage induced by doxorubicin	Ribeiro <i>et al.</i> 2010	18
	Male Wistar rats	DNA damage induced by doxorubicin	Marques <i>et al.</i> 2016	18
	BALB/c mice	DNA damage induced by cyclophosphamide	Schauss <i>et al.</i> 2010 ^a	18
	Wistar rats	Acute and subchronic oral toxicity study	Schauss <i>et al.</i> 2010 ^a	18

AOM = azoxymethane; BBN = N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine; B16F10 = melanoma cell lines; DSS = dextran sulfate sodium; DMH = 1,2-dimethylhydrazine; ICR = International Cancer Research; MNU = N-methyl-N-nitrosourea; NMBA = N-nitrosomethylbenzylamine.

^aA reference can have more than one model of disease.

Table 2. Basic information regarding the *E. oleracea* extract used in the *in vivo* experimental models.

Fraction	Origin of açai	Dosing	Diluent and placebo	Administration	Posology	Reference
Juice^b	Not mentioned	0.1 mg/0.15mL	Saline	Oral (gavage) and IP	1 daily dose over 7 days	Schauss <i>et al.</i> 2010 ^a
	Not mentioned	5,000 and 20,000 mg/kg	Not mentioned	Oral (gavage)	Single dose	Schauss <i>et al.</i> 2010 ^a
	Not mentioned	10,000; 20,000 and 40,000 mg/kg	Saline	Oral (gavage)	1 daily dose over 90 days	Schauss <i>et al.</i> 2010 ^a
Oil	Brazil (Amapá)	30, 100 and 300 mg/kg	Tween	Oral (gavage)	1 daily dose over 14 days	Marques <i>et al.</i> 2016
	Not mentioned	50 mg/mL	PBS	Intratumoral	Five applications within 15 days (1, 4, 7, 10 and 13 days)	Monge-Fuentes <i>et al.</i> 2017
Pulp	Brazil	5%	AIN diet	Oral (diet)	35 weeks	Stoner <i>et al.</i> 2010
	Brazil (SP)	3,330; 10,000 and 16,670 mg/kg	Saline	Oral (gavage)	Single dose	Ribeiro <i>et al.</i> 2010 ^a
	Brazil (SP)	3,330; 10,000 and 16,670 mg/kg	Distilled water	Oral (gavage)	1 daily dose over 14 days	Ribeiro <i>et al.</i> 2010 ^a
	Brazil (Pará)	2.5% and 5%	Standard diet	Oral (diet)	10 weeks	Fragoso <i>et al.</i> 2012 and 2013 ^a
	Brazil (Pará)	5%	Standard diet	Oral (diet)	20 weeks	Fragoso <i>et al.</i> 2013 ^a
	Brazil (Pará)	2.5% and 5%	Diet formulated ^c	Oral (diet)	14 weeks	Choi <i>et al.</i> 2017
Seed	Brazil	100 and 200 mg/mL	Ethanol-water	Oral (gavage)	1 daily dose over 14 days	Nascimento <i>et al.</i> 2016

AIN = American Institute of Nutrition; IP = intraperitoneal; SP = São Paulo; PBS = Phosphate buffered saline.

^a A reference can have different methods of administration of açai.

^bJuice of MonaVie Active® = In addition to açai, contains lesser amounts of 19 fruits and berries.

^cA cereal-based commercial diet for mice formulated by the Orient Bio Group (Seongnam, Korea).

Table 3. Results of cancer treatments and safety evaluations of *E. oleracea* extract in animal models.

References	Therapeutic indication	Action of açai	Unchanged parameters	Effects of açai
Stoner <i>et al.</i> 2010	Chemopreventive	↓ incidence, multiplicity and inflammatory cytokines; ↑ serum antioxidant capacity and IFN γ	Body weight, food consumption, pro and antiinflammatory	Inhibits esophageal tumorigenesis progression
Fragoso <i>et al.</i> 2012	Chemopreventive (anticarcinogenic)	↓ incidence, multiplicity, tumor cell proliferation, urothelial preneoplastic lesions, p63 and PCNA expression and DNA damage	Body weight, food consumption, bladder and kidney weight, kidney biochemical markers, cytoplasmatic and nuclear β -catenin expression	Inhibits urothelial bladder carcinogenesis
Fragoso <i>et al.</i> 2013	Chemopreventive	↓ invasiveness, multiplicity and growth of tumor, cell proliferation and cleaved caspase-3, number of aberrant crypts	Body weight, food consumption, β -catenin expression and toxicity	Inhibits colon carcinogenesis
Nascimento <i>et al.</i> 2016	Anticarcinogenic	↓ tumor, muscle total protein; ↑ oxidative stress in cerebral cortex	Liver protein, oxidative stress in muscle and liver	Reduces Walker-256 tumor
Choi <i>et al.</i> 2017	Anticarcinogenic	↓ incidence, multiplicity and tumor, cell proliferation, proinflammatory cytokines and COX-2; ↑ cleaved-caspase-3 expression.	Not mentioned	Inhibits colon carcinogenesis
Monge-Fuentes <i>et al.</i> 2017	Anticarcinogenic (Photodynamic)	↓ tumor, liver and spleen weight; ↑ necrosis; Differences in body weight	Toxicity of the kidneys and lungs	Reduces melanoma carcinogenesis (photosensitizer)
Ribeiro <i>et al.</i> 2010	Protective effects	↓ MNPCE and DXR-induced genotoxicity in bone marrow or liver and kidney cells	PCE, DNA damage and genotoxic effects	Reduction in DNA damage induced by DXR

Schauss <i>et al.</i> 2010	Not mentioned	Not mentioned	Body weight, food consumption, mortality, organ weights, ophthalmology, urinalysis, hematological and biochemical parameters, and genotoxicity	Negative mutagenic effects
Marques <i>et al.</i> 2016	Not mentioned	↑ cell viability	DNA damage, clastogenic and aneugenic effect	Negative genotoxicity effects

COX-2 = cyclooxygenase 2; DXR = antitumoral agent doxorubicin; IFN γ = interferon gamma; MNPCE = number of micronucleated peripheral blood polychromatic erythrocytes cells; PCE = peripheral blood polychromatic erythrocytes cells; PCNA = proliferating cell nuclear antigen.

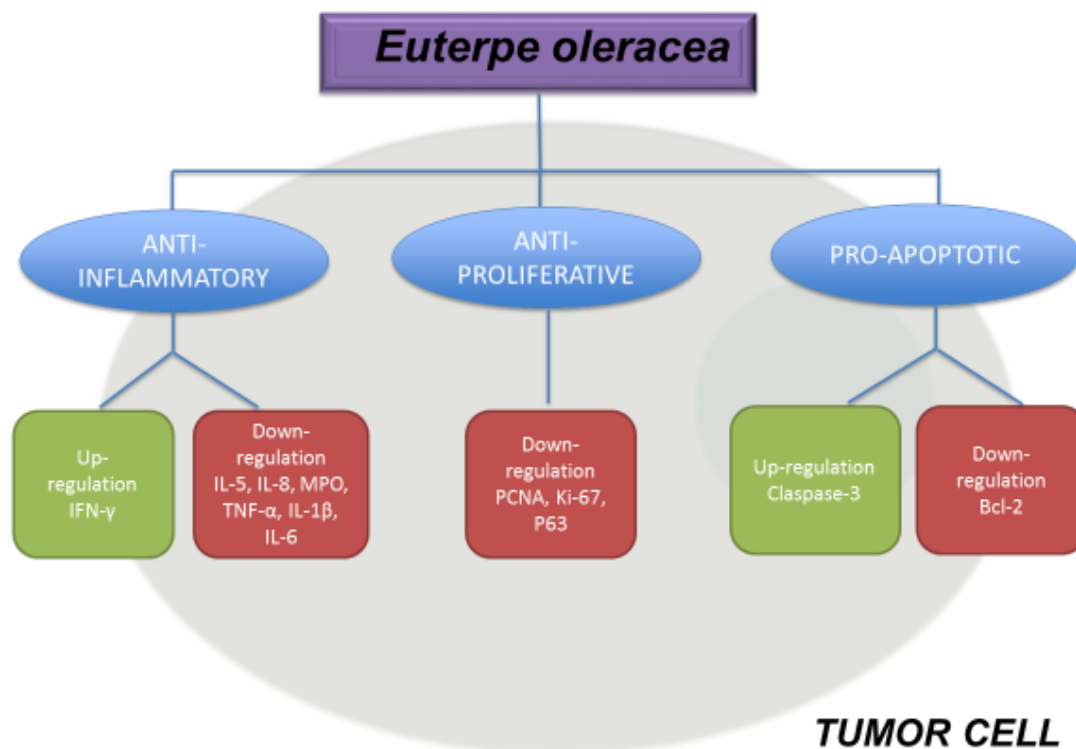


Fig. 2 Schematic representation of the Açaí effects in tumor cell. Açaí was shown anti-tumoral functions due its anti-inflammatory, anti-proliferative and pro-apoptosis properties.

7. DISCUSSÃO

Atualmente, a endometriose é um problema global de saúde pública que reduz significativamente a qualidade de vida em função dos sintomas dolorosos e graves como dispareunia e dor crônica, em especial, pela infertilidade (DE GRAAFF et al 2013, NNOAHAM et al 2011, PERINI et al 2014). O arsenal medicamentoso atualmente existente para o tratamento clínico da endometriose visa tornar um meio hormonal esteroide estável, podendo também inibir a ovulação e a menstruação (VERCELLINI et al 2008; 2009a). Esses tratamentos farmacológicos buscam apenas o alívio dos sintomas, assim as lesões endometrióticas são capazes de sobreviver (JOHNSON et al., 2013, VERCELLINI et al., 2011). Portanto, a busca por novas terapias para o tratamento da endometriose continua sendo necessária.

Nos últimos anos, tem havido grande interesse científico em produtos químicos e investigações farmacológicas das propriedades biológicas de plantas medicinais. Sendo assim, no presente estudo, investigamos as ações farmacológicas do extrato de açaí, um fruto encontrado em grande quantidade na região amazônica (LICHTENTHÄLER et al., 2005; SCHAUSS et al., 2006a) que possui propriedades farmacológicas relacionadas com atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígenas (HEINRICH, DHANJI e CASSELMAN, 2011; SILVA et al., 2014).

Para se testar um composto candidato a fármaco, faz-se necessário obrigatoriamente, que o mesmo seja testado em estudos pré-clínicos, sendo conduzidos de acordo com as Boas Práticas de Laboratório (BPL) e os animais em teste, devem ser saudáveis, preferencialmente livre de patógenos (HURSTING et al., 2005; ANVISA, 2013). Os estudos pré-clínicos em modelos animais auxiliam no conhecimento da fisiologia e etiopatogenia das doenças, bem como, no estudo da ação de medicamentos ou dos efeitos das intervenções cirúrgicas (FERREIRA et al., 2005). Os estudos pré-clínicos realizados em modelos animais incluem: estudos de toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade, além da avaliação da segurança farmacológica e da toxicocinética (ANVISA, 2013). Caso necessário, outros estudos de segurança podem ser empregados.

Os modelos experimentais de endometriose são de extrema importância para o entendimento da doença e para identificação de novos tratamentos para realização de testes pré-clínicos (ATTAR et al 2015). No presente estudo foi estabelecido um modelo

experimental de endometriose peritoneal, em que foi observado que as lesões endometrióticas são císticas e vascularizadas, possuem um alto potencial angiogênico e que o tecido endometriótico das ratas é similar ao humano, com lesões contendo glândulas endometriais e estroma, estando de acordo com o que foi anteriormente descrito pelo nosso grupo (MACHADO, et al 2008). De acordo com o que já foi descrito anteriormente, após estabelecimento da lesão (15 dias após o implante inicial), as lesões aderiram e cresceram completamente na cavidade peritoneal (MACHADO et al 2010a, 2010b, 2014, 2015).

Em seguida, iniciamos o tratamento com açai e/ou salina durante 30 dias consecutivos. Neste estudo, a fração de açai utilizada foi o extrato hidroalcoólico do caroço de açai, anteriormente descrito como o componente mais ativo da fruta (ROCHA et al 2007). A dose de açai utilizada (200 mg/kg) está de acordo com outros estudos (COSTA et al 2012, DE BEM et al 2014, COSTA et al 2017). Costa et al (2012), utilizou um modelo de hipertensão em ratos Wistar tratado com açai e observou que o tratamento produziu um efeito anti-hipertensivo e evita a disfunção endotelial, possivelmente pela sua ação antioxidante, pela inibição da enzima metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) e ativação da via óxido nítrico sintase (NOS) (COSTA et al 2012). Bem et al (2014), investigou o efeito do extrato de semente açai nas alterações cardiovasculares e renais de animais na fase adulta, cujas mães foram alimentadas com uma dieta pobre em proteínas durante a gravidez e observou que o açai previne contra hipertensão, estresse oxidativo e alterações funcionais e estruturais renais, sugerindo uma atividade vasodilatadora e antioxidante (DE BEM et al 2014). Outro estudo realizado por Costa et al 2017, utilizou o açai no tratamento de lesões renais isquêmicas crônicas em ratos hipertensivos renovasculares e observou que açai foi capaz de impedir a disfunção e lesão renal sugerindo seus efeitos anti-hipertensivos e antioxidantes (COSTA et al 2017). Os resultados significativos com a administração oral de açai também foram descritos em outras doenças e doses. Sudo et al (2010) realizou um estudo para observar os efeitos antinociceptivos do extrato hidroalcoólico de açai em um modelo de roedores de dor aguda e neuropática e observou que açai nas doses 30, 100 ou 300 mg/kg reduziu de forma dependente da dose as respostas nociceptivas (SUDO et al 2015). De Oliveira et al (2010), avaliou os efeitos do tratamento com açai em modelo de síndrome metabólica induzida por dieta rica em gordura e observou que açai (300 mg/kg) durante 5 dias foi eficaz na prevenção da síndrome metabólica pela redução do perfil lipídico, níveis de glicose e resistência a

insulina (DE OLIVEIRA et al 2010). Em estudo do tratamento com açai na inflamação pulmonar aguda induzida por fumaça de cigarro, extrato hidroalcoólico de açai na dose de 300 mg/kg foi eficaz na redução de citocinas inflamatórias, sendo capaz de reduzir ações inflamatórias e oxidantes provocadas pela fumaça de cigarro (MOURA et al 2012). Estudo da lesão por isquemia/reperfusão renal tratada com açai (500 mg/kg ou 1000 mg/kg) observou que açai dependentemente da dose, reduziu significativamente o dano renal, pela diminuição dos níveis de nitrogênio ureico, creatinina sérica e ainda inibiu a atividade sérica da lactato desidrogenase (LDH) (EL MORSY et al 2015). O presente estudo é o primeiro a demonstrar o efeito do extrato de açai na redução das lesões de endometriose em modelo experimental de endometriose peritoneal.

Em nossos resultados, as análises histológicas mostraram a viabilidade das lesões, tendo características morfológicas definidas (presença de um estroma muito celular e/ou glândulas endometriais retilíneas) no grupo controle quando comparado às lesões dos animais tratados com açai. O tratamento mostrou uma redução no tamanho e na viabilidade dos implantes. Resultados semelhantes foram observados no tratamento da endometriose com substâncias naturais. Um estudo avaliou o potencial terapêutico do extrato de ginseng vermelho em modelo *in vivo* com camundongos tratados por 8 semanas com 0,1 mg/g ou 0,2 mg/g e observou uma redução significativa do tamanho e caráter fibrótico das lesões endometrióticas no grupo tratado quando comparado ao controle (KIM et al 2017a). Outro extrato testado para o tratamento da endometriose foi o da flor de Pueraria (150 ou 300 mg/kg durante 5 semanas), sendo observado um número reduzido de lesões endometrióticas totais nos animais tratados quando comparados ao controle (KIM et al 2017b). A redução das lesões endometrióticas pode estar relacionada à atividade anti-inflamatória desses compostos (LIM et al 2015). Em nosso estudo o açai foi capaz de reduzir as lesões possivelmente devido à sua composição rica em polifenóis e flavonoides (SCHAUSS et al., 2006a; ULBRICHT et al., 2012).

A produção de estrogênio acelera a síntese de prostaglandina, estimulada pela atividade de COX-2, aumentando a inflamação (MAIA et al 2012). A endometriose é uma doença com perfil inflamatório e a expressão de COX-2 está significativamente elevada no epitélio glandular e nas células estromais de mulheres com endometriose (JANA et al 2016). Alguns autores descreveram a importância da liberação de VEGF mediada por PGE-2 (LASCHKE et al 2007b, OLIVARES et al 2008). Em nosso estudo foi observado que o açai apresenta atividade anti-inflamatória pela inibição da COX-2 e

PGE-2 no grupo tratado com açaí quando comparado ao controle. Poulouse et al 2012 investigou o efeito do açaí sobre o estresse oxidativo e inflamação induzido por lipopolissacarídeos em células microgлияis do cérebro de rato e observou que o açaí foi capaz de reduzir significativamente os níveis de COX-2, atuando como um possível anti-inflamatório (POULOSE et al 2012). Esses achados podem estar relacionados com a presença de antocianinas na composição do açaí (HEINRICH et al 2011). Um estudo investigou a atividade de polifenóis do açaí no tratamento de células de câncer de cólon humanas e observou que o extrato foi capaz de inibir seu crescimento com atividades anti-inflamatórias e citotóxicas podendo sugerir um efeito quimiopreventivo natural (DIAS et al 2014).

Sabe-se que a angiogênese é um processo fundamental na patogênese da endometriose, visto que as lesões endometrióticas são vascularizadas e requerem nutrição adequada para sua sobrevivência (ROCHA et al 2013, GROOTHUIS et al 2005). Por esse motivo, a endometriose apesar de benigna, muitas vezes apresenta características de malignidade (MACHADO et al 2014, KUMAR et al 2011), visto que a angiogênese está envolvida no processo de crescimento tumoral (HANAHAN et al 1996). Alguns estudos observaram uma atividade antitumorigênica do açaí em câncer em modelo animal (STONER et al 2010, FRAGOSO et al 2012, FRAGOSO et al 2013, NASCIMENTO et al 2016, CHOI et al 2017, MONGE-FUENTES et al 2017). Choi et al (2017) investigaram o efeito protetor do açaí no desenvolvimento da carcinogênese de cólon induzida por azoximetano (AOM) e sulfato de dextrano (DSS) e observaram que o açaí foi capaz de reduzir a incidência e multiplicidade tumoral, proliferação celular e algumas citocinas inflamatórias (CHOI et al 2017). Resultado semelhante foi encontrado por Fragoso et al 2012 em estudo para avaliar o efeito do tratamento do açaí em modelo de carcinogênese de bexiga urinária induzida por N-butil-N- (4-hidroxibutil) nitrosamina (BBN) e N-metil-N-nitrosourea (MNU), e foi observada uma redução da incidência e multiplicidade tumoral, além da proliferação celular (FRAGOSO et al 2012). Estes resultados podem ser atribuídos ao rico conteúdo de polifenóis, antocianinas e flavonóides no açaí, pois já foi observado que essas substâncias possuem atividade anticancerígena (SILVA et al 2014, DEL-POZO INSFRAN et al 2006).

Sendo o VEGF o principal fator pró-angiogênico, é observado um aumento na expressão e distribuição do mesmo em mulheres com endometriose, comparadas com o controle (MCLAREN et al 1996, MACHADO et al 2008, MACHADO et al 2010; VERIT et al 2013). Em nosso estudo a imunomarcagem de VEGF e seu receptor FLK-1,

assim como os níveis séricos de VEGF das ratas tratadas com açaí foram significativamente menores quando comparados ao grupo controle. Resultados semelhantes de expressão reduzida de VEGF foram relatados em modelos de endometriose tratados com 65 mg/kg de epigallocatequina-3-galato por 14 dias quando comparado ao grupo controle (LASCHKE et al 2008). Ergenoglu et al. (2013) avaliou o efeito do resveratrol em modelo de endometriose induzido experimentalmente e observou uma redução significativa no tamanho do implante, nos níveis e expressão de VEGF no fluido peritoneal e plasma dos animais tratados com 10 mg/kg de resveratrol durante 14 dias quando comparado ao controle (ERGENOGLU et al 2013). Saltan et al (2016) avaliaram o tratamento da endometriose induzida em ratas Sprague-Dawley e tratadas com frutos de *Viburnum opulus L* (100 mg/kg) durante 28 dias e observaram que os níveis de VEGF foram reduzidos no fluido peritoneal desses animais quando comparado ao controle (SALTAN et al 2016). Utilizando esse mesmo modelo, Demirel et al (2014), testaram a *Achillea biebersteinii Afan* (2 ml/rato) durante 4 semanas e observaram uma redução nos níveis de VEGF quando comparado ao controle (DEMIREL et al 2014). Ainda sobre a redução de VEGF em modelo experimental de endometriose, Wang et al (2013), testaram um pró-fármaco de epigallocatequina-3-galato em camundongos (50 mg/kg) durante 4 semanas e observaram que houve uma redução de VEGF no grupo tratado quando comparado ao controle além de diminuir significativamente o crescimento, peso e tamanho dos implantes endometriais atuando como um promissor agente antiangiogênico (WANG et al 2013). Dias et al (2014), observaram em estudo in vitro com linhagens de células SW-480 de carcinoma de cólon, uma redução do VEGF sugerindo que os flavonoides presentes no açaí provavelmente são os responsáveis pela atividade antiangiogênica, via VEGF (DIAS et al 2014).

Outro fator pró-angiogênico importante é a MMP. Esta é essencial para a degradação da matriz extracelular, o que contribui para o desenvolvimento da endometriose, sendo encontrado um aumento da liberação do tipo 9 (MMP-9) no endométrio tópico de mulheres com endometriose (COLETTE et al 2009). Nossos resultados mostraram significativa marcação de MMP-9 no grupo controle, o que não foi observado no grupo tratado com *E. oleracea*. Estudo similar usando a curcumina demonstrou redução de MMP-9 na endometriose cirurgicamente induzida em camundongos após tratamento com esse extrato (SWARNAKAR et al 2009). Outro estudo identificou uma redução de MMP-9 na endometriose, após tratamento com

Cervus elaphus (50 e 100 µg / ml) em células endometrióticas 11Z e 12Z (KIM et al 2012). Além disso, em outro estudo com açaí, Costa et al. demonstraram que o tratamento com açaí reduziu as MMPs em hipertensão experimental e sugeriu que essa redução é proveniente da atividade antioxidante do extrato (COSTA et al 2012).

O (NO) desempenha um papel fundamental na regulação de vários processos fisiopatológicos, vasodilatação, angiogênese, inflamação, resposta imune, agregação plaquetária e cicatrização de feridas (PRUDENTE et al 2013). Estudos experimentais demonstraram que o NO exógeno pode produzir uma resposta inflamatória precoce, aumento dos níveis de macrófagos, concentração de fibroblastos, expressão de MMP, deposição de colágeno, VEGF e angiogênese (MORETTI et al 2012, ARBOS et al 2006). Em nosso estudo foi possível observar que a presença de macrófagos F4/80 positivos e concentrações de NO foram maiores em lesões endometrióticas no grupo controle e que o açaí foi capaz de reduzir esses níveis após 30 dias de tratamento. Um estudo conduzido por Carey et al (2017), observou, em células microgliciais BV-2 de ratos alimentados com açaí, uma menor produção de (NO) do que nas células de ratos controle (CAREY et al 2017).

Os macrófagos desempenham um papel fundamental na angiogênese inflamatória e tumoral. A atividade angiogênica dos macrófagos é conhecida por estar associada às suas propriedades secretoras. Uma das substâncias secretadas pelo macrófago é o VEGF sendo fundamental no estabelecimento e crescimento das lesões de endometriose (OWEN et al 2013). Sendo assim, foi proposto, a partir dos nossos resultados, um mecanismo de ação para o açaí na endometriose, envolvendo o macrófago e os demais marcadores analisados (MACHADO et al 2016). O VEGF em grande quantidade retorna ao macrófago ativado e liga-se ao seu receptor VEGFR-2. Esta sinalização aumenta a regulação da transformação de MMP-9 induzindo a remodelação da matriz extracelular e promovendo o aumento da densidade vascular (JEON et al 2007). Além disso, os macrófagos ativados são capazes de sintetizar uma alta concentração de iNOS gerando NO (ESPOSITO et al 2006). Por outro lado, este processo aumentou os níveis de COX-2 e PGE2 para aumentar o processo inflamatório e a angiogênese (MACHADO et al 2010, OLIVARES et al 2008). Portanto, com a realização deste trabalho, foi possível verificar que o açaí atua na redução do número de macrófagos ativados, resultando na diminuição da expressão dos genes alvo, como o VEGF, iNOS e COX-2, e conseqüentemente na supressão da manutenção e crescimento das lesões de endometriose (MACHADO et al., 2016).

Além de ter sido o primeiro trabalho a avaliar o efeito terapêutico do extrato de açaí em modelo *in vivo* de endometriose, uma vantagem do nosso estudo foi o tratamento por via oral (gavagem), o que permite que toda a dose do extrato seja administrada, visto que alguns estudos realizam o tratamento na água ou juntamente com a ração dos animais, não controlando a quantidade administrada (STONER et al 2010, FRAGOSO et al 2012, 2013; DE SOUZA et al 2012), além da facilidade da via de administração quando comparados aos tratamentos por via intraperitoneal ou intravenoso (CEYHAN et al 2011, SCHAUSS et al 2010; MONGE-FUENTES et al 2017). Outro ponto importante do nosso estudo foi a avaliação de marcadores sabidamente envolvidos no desenvolvimento da endometriose (F4-80, COX-2, PGE-2, VEGF e MMP-9). No entanto, uma limitação do estudo é que não foi possível avaliar a segurança e toxicidade do açaí, nem mesmo os níveis glicêmicos, perfil colesterolêmico e marcadores hepáticos.

Considerando o trabalho de revisão sistemática referente a segurança/toxicidade do açaí e seu efeito em modelos experimentais de câncer, os resultados indicaram que, em comparação com o grupo controle, o açaí apresentou um efeito quimiopreventivo (anticancerígeno), com atividade antiproliferativa e anti-inflamatória (STONER et al 2010, FRAGOSO et al 2012, FRAGOSO et al 2013, NASCIMENTO et al 2016, CHOI et al 2017, MONGE-FUENTES et al 2017). Além disso, estudos toxicológicos demonstraram que o açaí não causou danos ao DNA e não apresentou efeitos genotóxicos ou mutagênicos nos animais avaliados (RIBEIRO et al 2010, SCHAUSS et al 2010, MARQUES et al 2016). Sugere-se que as antocianinas são os principais compostos da polpa de açaí responsáveis pelo efeito antígenotóxico (SANTOS et al 2008; SCHAUSS et al. 2006a). Esse estudo de revisão avaliou os artigos incluídos pelo método de qualidade QATRS (BASHARDOUST TAJALI et al 2010) e todos os trabalhos apresentaram uma pontuação de qualidade significativa, acima de 16/20 (RIBEIRO et al 2010, SCHAUSS et al 2010, STONER et al 2010, FRAGOSO et al 2012, FRAGOSO et al 2013, MARQUES et al 2016, NASCIMENTO et al 2016, CHOI et al 2017, MONGE-FUENTES et al 2017). O QATRS é um gráfico de avaliação de 20 pontos, com a finalidade de avaliar aleatorização, cegamento, similaridade do modelo animal/tecido com aplicações humanas, padronização e confiabilidade de técnicas de medição, gerenciamento de levantamentos de estudos e adequação de métodos estatísticos (BASHARDOUST TAJALI et al 2010; DOS SANTOS et al 2017). Realizamos uma pesquisa extensa e abrangente da literatura (quatro bases de dados),

porém não foram encontrados mais estudos, sendo uma limitação o pequeno número de estudos incluídos e a pesquisa ter identificado apenas artigos em inglês.

Como resultado desta revisão foi possível observar que o pós-tratamento de açaí em animais com câncer resultou, na diminuição dos níveis de IL-5 e IL-8 bem como a COX-2, MPO e outras citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Alguns estudos observaram que a exposição crônica a citocinas pró-inflamatórias, causa tumorigênese (BECKER et al 2004, POPIVANOVA et al 2008, GRIVENNIKOV et al 2009). A IL-5 é uma citocina produzida por células CD4 + Th2, mastócitos, eosinófilos e basófilos participando de várias etapas do desenvolvimento e função dos eosinófilos (SCHOLLAERT et al 2014) e GRO/KC é o análogo de rato para a interleucina-8 humana (IL-8), um mediador derivado dos macrófagos da angiogênese (KOCH et al 1992). Os estudos com açaí em modelos experimentais de câncer também sugerem que o extrato possa estar envolvido na redução da proliferação e no aumento da morte celular, e que sua atividade anti-proliferativa está envolvida na redução dos níveis de PCNA, Ki-67 e p63, marcadores encontrados altamente expressos em tumores (SHI et al 2018, VETTERLEIN et al 2017, SARITHA et al 2018). A atividade anti-apoptótica do açaí é marcada pela redução de Bcl-2, uma proteína oncogênica que participa da regulação da apoptose (SONG et al 2017). Além disso, o açaí se mostrou eficiente na redução de Bcl-2 em estudo *in vitro* de células de câncer de cólon, inibindo o crescimento celular (DIAS et al 2014).

Finalmente, considerando a eficácia do açaí em modelo experimental de endometriose e de diferentes tipos de câncer, além da ausência de toxicidade nas doses terapêuticas testadas, justifica-se a utilização do extrato no tratamento da endometriose e de doenças dependentes da angiogênese e inflamação, como é o caso do câncer e da endometriose. A abundância do fruto em certas regiões do Brasil, assim como o seu baixo custo aquisitivo são fatores relevantes que podem contribuir para o desenvolvimento econômico e social do país, considerando doenças (endometriose e câncer), que atualmente oneram drasticamente o sistema público de saúde.

8. CONCLUSÃO

O efeito farmacológico do açaí nos processos angiogênicos, inflamatórios e oxidantes da endometriose experimental foram confirmados, com sucesso, permitindo que este extrato seja futuramente testado como um possível tratamento clínico da doença.

Em relação a revisão sistemática, pode-se concluir que o açaí é um agente quimiopreventivo e anticancerígeno, que apresenta propriedades anti-inflamatórias, antiproliferativa e pró-apoptótica, sem apresentar efeitos genotóxicos nos modelos pré-clínicos de toxicidade.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABBOTT J. A.; HAWE J.; CLAYTON R.D.; GARRY R.. The effects and effectiveness of laparoscopic excision of endometriosis: a prospective study with 2-5 year follow-up. **Hum. Reprod.**, v. 18, n. 9, p. 1922–1927, set. 2003.

ABRAO M. S. **Endometriose - Uma visão contemporânea**. 1. ed. [s.l.] Revinter, 2000.

ABRAO M. S.; NEME R.M.; CARVALHO F.M. et al. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. **Int J Gynaecol Obstet.**, v. 82, n. 1, p. 31–40, jul. 2003.

ABRAO M. S.; GONÇALVES MO.; DIAS J.A. et al. Comparison between clinical examination, transvaginal sonography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep endometriosis. **Human reproduction**, v. 22, n. 12, p. 3092–3097, dez. 2007.

ABRAO MS, PETRAGLIA F, FALCONE T. et al. Deep endometriosis infiltrating the recto-sigmoid: critical factors to consider before management. **Hum Reprod Update**. 2015 May-Jun;21(3):329-39.

ACIÉN, P.; VELASCO, I. Endometriosis: A Disease That Remains Enigmatic. **ISRN Obstetrics and Gynecology**, v. 2013, p. 1–12, 2013.

AHN SH, MONSANTO SP, MILLER C, et al. Pathophysiology and Immune Dysfunction in Endometriosis. **Biomed Res Int**. 2015;2015:795976.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**, 2013.

ARBOS M.A.; FERRANDO J.M.; QUILES M.T.; VIDAL J. et al. Improved surgical mesh integration into the rat abdominal wall with arginine administration. **Biomaterials**, v. 27, n. 5, p. 758-768, 2006.

ARRUDA MS, PETTA CA, ABRÃO MS, et al. Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women. **Hum Reprod**. 2003 Apr;18(4):756-9.

ASRM. **American Society For Reproductive Medicine. Revised American Fertility Society Classification Of Endometriosis**, 1997.

ATTAR R.; ATTAR E. Experimental treatments of endometriosis. **Women's Health.**, v. 11, n. 5, p. 653–664, ago. 2015.

BAHAMONDES, L. **Câncer de Endométrio: o que considerar?** [s.l.] Rev. Assoc. Med. Bras, 2004. v. 50

BASHARDOUST TAJALI, S. et al. Effects of low power laser irradiation on bone healing in animals: a meta-analysis. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 5, n. 1, p. 1, 2010.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 556–563, abr. 2010.

BECKER, C., FANTINI, M.C., SCHRAMM, C., LEHR, C., WIRTZ, S. et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 491-501, oct. 2004.

BEDAIWY, M. A. et al. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 17, n. 2, p. 426–431, fev. 2002.

BEDAIWY, M. A. et al. Medical Management of Endometriosis in Patients with Chronic Pelvic Pain. **Seminars in reproductive medicine**, v. 35, n. 1, p. 38–53, jan. 2017.

BEDNARCZUK, V. O. et al. TESTES IN VITRO E IN VIVO UTILIZADOS NA TRIAGEM TOXICOLÓGICA DE PRODUTOS NATURAIS. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, 31 dez. 2010.

BELLELIS, P. et al. Epidemiological and clinical aspects of pelvic endometriosis—a case series. **Revista Da Associação Médica Brasileira (1992)**, v. 56, n. 4, p. 467–471, ago. 2010.

BEREK, J. **Tratado de ginecologia**. 14. ed. [s.l.] Guanabara-Kogan, 2008.

BERTSCHI, D. et al. Enhanced inflammatory activity of endometriotic lesions from the rectovaginal septum. **Mediators of inflammation**, v. 2013, p. 450950, 2013.

BIANEK-BODZAK, A. et al. The importance and perspective of magnetic resonance imaging in the evaluation of endometriosis. **BioMed research international**, v. 2013, p. 436589, 2013.

BORGFELDT, C.; ANDOLF, E. Cancer risk after hospital discharge diagnosis of benign ovarian cysts and endometriosis. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 83, n. 4, p. 395–400, abr. 2004.

BOURLEV, V.; LARSSON, A.; OLOVSSON, M. Elevated levels of fibroblast growth factor-2 in serum from women with endometriosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 194, n. 3, p. 755–759, mar. 2006.

BRINTON, L. A. et al. Relationship of benign gynecologic diseases to subsequent risk of ovarian and uterine tumors. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 14, n. 12, p. 2929–2935, dez. 2005.

BULUN, S. E. Endometriosis. **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 3, p. 268–279, 15 jan. 2009.

BUSACCA, M. Endometriosis: laparoscopic treatment. **Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology**, v. 26, n. 1, p. 33–35, 1999.

CARDOSO, J. V. et al. Combined effect of vascular endothelial growth factor and its receptor polymorphisms in endometriosis: a case-control study. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 209, p. 25–33, fev. 2016.

CARDOSO, J.V. et al. Combined effect of the PGR +331C>T, CYP17A1 -34A>G and CYP19A1 1531G>A Polymorphisms on the Risk of Developing Endometriosis. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 39, n. 6, p. 273-281, jun. 2017.

CAREY A.N.; MILLER M.G.; FISHER D.R.; BIELINSKI D.F. et al. Dietary supplementation with the polyphenol-rich açai pulps (*Euterpe oleracea* Mart. and *Euterpe precatoria* Mart.) improves cognition in aged rats and attenuates inflammatory signaling in BV-2 microglial cells. *Nutr Neurosci*, v. 20, n. 4, p. 238-245, 2017.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 3, p. 448–464, jun. 2004.

CAVALCANTI, V. et al. Evaluation of the frequency of G-765C polymorphism in the promoter region of the. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 293, n. 1, p. 109–115, jan. 2016.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289–299, set. 2004.

CEYHAN S.T.; ONGURU O.; FJDAN U.; IDE T. et al. Comparison of aromatase inhibitor (letrozole) and immunomodulators (infliximab and etanercept) on the regression of endometriotic implants in a rat model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, v. 154, n. 1, p. 100-104, 2011.

CHANG, H. J. et al. Overexpression of Four Joint Box-1 Protein (FJX1) in Eutopic Endometrium From Women With Endometriosis. **Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, p. 1933719117716780, 1 jan. 2017.

CHAPRON C, SANTULLI P, DE ZIEGLER D, et al. Ovarian endometrioma: severe pelvic pain is associated with deeplyinfiltrating endometriosis. **Hum Reprod** 2012;27:702–711.

CHISHIMA, F. et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 in local lesions of endometriosis patients. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 48, n. 1, p. 50–56, jul. 2002.

CHIN, Y.-W. et al. Lignans and Other Constituents of the Fruits of *Euterpe oleracea* (Açaí) with Antioxidant and Cytoprotective Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7759–7764, 10 set. 2008.

CHISHIMA, F. et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 in local lesions of endometriosis patients. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 48, n. 1, p. 50–56, jul. 2002.

CHOI, Y. J. et al. Açai Berries Inhibit Colon Tumorigenesis in Azoxymethane/Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice. **Gut and Liver**, v. 11, n. 2, p. 243–252, 15 mar. 2017.

CHUNG, A. S.; LEE, J.; FERRARA, N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. **Nature Reviews. Cancer**, v. 10, n. 7, p. 505–514, 2010.

COLLETTE, T. et al. Evidence for an increased release of proteolytic activity by the eutopic endometrial tissue in women with endometriosis and for involvement of matrix metalloproteinase-9. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 19, n. 6, p. 1257–1264, jun. 2004.

COLLETTE, T. et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in the eutopic endometrial tissue of women with endometriosis. **Human Reproduction**, v. 21, n. 12, p. 3059–3067, 2 out. 2006.

COLETTE S.; DONNEZ J. Endometriosis. **N Engl J Med**, v. 360, n. 18, p. 1911-1912, 2009.

CONCEIÇÃO, J. C. DE J.; SILVA, J. G. DE A. E. **Ginecologia fundamental**. São Paulo: Atheneu, 2006.

DAVIS, L. et al. Oral contraceptives for pain associated with endometriosis. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 3, p. CD001019, 18 jul. 2007.

DA COSTA, C. A.; DE OLIVEIRA, P. R. B.; DE BEM, G. F. et al. *Euterpe Oleracea* Mart.-Derived Polyphenols Prevent Endothelial Dysfunction and Vascular Structural Changes in Renovascular Hypertensive Rats: Role of Oxidative Stress. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v 385, n 12, p 1199-1209, 2012.

DA COSTA, C. A. et al. Effect of *Euterpe oleracea* Mart. Seeds Extract on Chronic Ischemic Renal Injury in Renovascular Hypertensive Rats. **Journal of medicinal food**, 26 jun. 2017.

DE BEM, G. F. et al. Protective effect of *Euterpe oleracea* Mart (acai) extract on programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction

during pregnancy. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 66, n. 9, p. 1328–1338, set. 2014.

DE GRAAFF A.A.; D'HOOGHE T.M.; DUNSELMAN, G.A. et al. The significant effect of endometriosis on physical, mental and social wellbeing: results from an international cross-sectional survey. **Hum Reprod**, v. 28, n. 10, p. 2677-2685, oct. 2013.

DE MOURA, R. S. et al. Addition of acai (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 4, p. 855–863, abr. 2011.

DE MOURA, R. S. et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 19, n. 3–4, p. 262–269, fev. 2012.

DE MOURA, R. S.; RESENDE, Â. C. Cardiovascular and Metabolic Effects of Açai, an Amazon Plant: **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 19–26, jul. 2016.

DE OLIVEIRA, P. R. B. et al. Effects of an extract obtained from fruits of *Euterpe oleracea* Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 619–626, dez. 2010.

DE OLIVEIRA, P. R. B. et al. *Euterpe oleracea* Mart.-Derived Polyphenols Protect Mice from Diet-Induced Obesity and Fatty Liver by Regulating Hepatic Lipogenesis and Cholesterol Excretion. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0143721, 2 dez. 2015.

DE SOUZA, M. O. et al. The hypocholesterolemic activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. **Nutrition Research**, v. 32, n. 12, p. 976–984, dez. 2012.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and pigment stability of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1539–1545, 24 mar. 2004.

DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Polyphenolics in Their Glycoside and Aglycone Forms Induce Apoptosis of HL-60 Leukemia Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1222–1229, fev. 2006.

DEMIREL, M. A. et al. Experimental endometriosis remission in rats treated with *Achillea biebersteinii* Afan.: histopathological evaluation and determination of cytokine

levels. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 175, p. 172–177, abr. 2014.

DIAS, M. M. DOS S. et al. Pro-apoptotic activities of polyphenolics from acai (*Euterpe oleracea* Martius) in human SW-480 colon cancer cells. **Nutrition and cancer**, v. 66, n. 8, p. 1394–1405, 2014.

DIAS, M. M. DOS S. et al. Anti-inflammatory activity of polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Martius) in intestinal myofibroblasts CCD-18Co cells. **Food Funct.**, v. 6, n. 10, p. 3249–3256, 2015.

DOS SANTOS S.A.; SERRA A.J.; STANCKER T.G.; SIMOES M.C.B. Effects of Photobiomodulation Therapy on Oxidative Stress in Muscle Injury Animal Models: A Systematic Review. *Oxid Med Cell Longev.*, 2017;2017:5273403.

DOS SANTOS T. A. T. et al. Phosphatidylserine Exposure by *Toxoplasma gondii* Is Fundamental to Balance the Immune Response Granting Survival of the Parasite and of the Host. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27867, 29 nov. 2011.

EL MORSY, E.M., AHMED, M.A., AHMED, A.A. Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by açai extract preconditioning in a rat model. *Life Sci.*, v. 123, p. 123-135, 15 fev. 2015.

ERGENOĞLU, A. M. et al. Regression of endometrial implants by resveratrol in an experimentally induced endometriosis model in rats. **Reproductive Sciences**, v. 20, n. 10, p. 1230–1236, out. 2013.

ESPOSITO G.; DE FILIPPIS D.; CIRILLO C.; The astroglial-derived S100beta protein stimulates the expression of nitric oxide synthase in rodent macrophages through p38 MAP kinase activation. *Life Sci.*, v. 78, n. 23, p. 2707-2715, 2006.

FAGOTTI, A. et al. Analysis of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in different sites of endometriosis and correlation with clinico-pathological parameters. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 19, n. 2, p. 393–397, fev. 2004.

FARLAND, L. V. et al. Endometriosis and the risk of skin cancer: a prospective cohort study. **Cancer Causes & Control**, 10 ago. 2017.

FAUCONNIER, A. et al. Comparison of patient- and physician-based descriptions of symptoms of endometriosis: a qualitative study. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 28, n. 10, p. 2686–2694, out. 2013.

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 280, n. 6, p. C1358-1366, jun. 2001.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. [Experimental models in research]. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 20 Suppl 2, p. 28–34, 2005.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 6, n. 4, p. 273–286, abr. 2007.

FOURQUET, J. et al. Patients' report on how endometriosis affects health, work, and daily life. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 7, p. 2424–2428, maio 2010.

FRAGOSO, M. F. et al. Inhibition of Mouse Urinary Bladder Carcinogenesis by Açai Fruit (*Euterpe oleraceae* Martius) Intake. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, n. 3, p. 235–241, set. 2012.

FRAGOSO, M. F. et al. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 58, p. 68–76, ago. 2013.

FREITAS, S. et al. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium. **Biology of reproduction**, v. 61, n. 4, p. 1070–1082, out. 1999.

GALLE, P. C. Clinical presentation and diagnosis of endometriosis. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, v. 16, n. 1, p. 29–42, mar. 1989.

GILBERT-ESTELLES, J. et al. Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 22, n. 8, p. 2120–2127, 2007.

GIUDICE, L. C.; KAO, L. C. Endometriosis. **Lancet (London, England)**, v. 364, n. 9447, p. 1789–1799, 13 nov. 2004.

GIUDICE, L. C. Clinical practice. Endometriosis. **The New England journal of medicine**, v. 362, n. 25, p. 2389–2398, 24 jun. 2010.

GOGUSEV, J. et al. Cellular and genetic constitution of human endometriosis tissues. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 7, n. 2, p. 79–87, abr. 2000.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil medicina**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

GONÇALVES MO, PODGAEC S, DIAS JA JR, et al. Transvaginal ultrasonography with bowel preparation is able to predict the number of lesions and rectosigmoid layers affected in cases of deep endometriosis, defining surgical strategy. **Hum Reprod** 2010;25:665–671.

GOODMAN; GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12^a ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2012.

GRIVENNIKOV, S., KARIN, E., TERZIC, J., MUCIDA, D., YU, GY., VALLABHAPURAPU, S. et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*, v. 15, n. 2, p. 103-113, 3 feb. 2009.

GROOTHUIS P.G.; NAP A.W.; WINTERHAGER E. et al. Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis*, v. 8, n. 2, p. 147-156, 2005.

GUZICK, D. S. et al. Randomized trial of leuprolide versus continuous oral contraceptives in the treatment of endometriosis-associated pelvic pain. *Fertility and sterility*, v. 95, n. 5, p. 1568–1573, abr. 2011.

HANAHAH, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, v. 86, n. 3, p. 353–364, 9 ago. 1996.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.)—A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. *Phytochemistry Letters*, v. 4, n. 1, p. 10–21, mar. 2011.

HEMMINGS, R. et al. Evaluation of risk factors associated with endometriosis. *Fertility and Sterility*, v. 81, n. 6, p. 1513–1521, jun. 2004.

HOTTAT, N. et al. Endometriosis: contribution of 3.0-T pelvic MR imaging in preoperative assessment--initial results. *Radiology*, v. 253, n. 1, p. 126–134, out. 2009.

HURSTING, S. D.; NUNEZ, N.; PATEL, A.; PERKINS, S. N.; LUBET, R.; BARRET, J. C. The utility of genetically altered mouse models for nutrition and cancer chemoprevention research. *Mutat Res*, v 576, p 80-92, 2005.

INES BARANAO, R. [Endometriosis. Why is not removed by the immune system?]. *Ginecologia y obstetricia de Mexico*, v. 82, n. 11, p. 755–763, nov. 2014.

JANA, S. et al. Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 Activity by COX-2-PGE2-pAKT Axis Promotes Angiogenesis in Endometriosis. *PloS one*, v. 11, n. 10, p. e0163540, 2016.

JENSEN, G. S. et al. In Vitro and in Vivo Antioxidant and Anti-inflammatory Capacities of an Antioxidant-Rich Fruit and Berry Juice Blend. Results of a Pilot and Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled, Crossover Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 18, p. 8326–8333, 24 set. 2008.

JEON S.H.; CHAE B.C.; KIM H.A.; SEO G.Y. et al. Mechanisms underlying TGF-beta1-induced expression of VEGF and Flk-1 in mouse macrophages and their implications for angiogenesis. *J Leukoc Biol.*, v. 81, n. 2, p. 557-566, 2007.

JOHNSON, N. P.; HUMMELSHOJ, L.; WORLD ENDOMETRIOSIS SOCIETY MONTPELLIER CONSORTIUM. Consensus on current management of

endometriosis. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 28, n. 6, p. 1552–1568, jun. 2013.

KALLURI, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. **Nature Reviews. Cancer**, v. 3, n. 6, p. 422–433, jun. 2003.

KANG, J. et al. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 610–617, out. 2010.

KENNEDY, S. et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 20, n. 10, p. 2698–2704, out. 2005.

KHAN, K. N. et al. Association of interleukin-6 and estradiol with hepatocyte growth factor in peritoneal fluid of women with endometriosis. **Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica**, v. 81, n. 8, p. 764–771, ago. 2002.

KHO, R. M.; ABRAO, M. S. Ovarian remnant syndrome: etiology, diagnosis, treatment and impact of endometriosis. **Current opinion in obstetrics & gynecology**, v. 24, n. 4, p. 210–214, ago. 2012.

KILICO, I. et al. Regression of experimentally induced endometriosis with a new selective cyclooxygenase-2 enzyme inhibitor. **Gynecologic and obstetric investigation**, v. 77, n. 1, p. 35–39, 2014.

KIM, J.H. et al. Deer (*Cervus elaphus*) antler extract suppresses adhesion and migration of endometriotic cells and regulates MMP-2 and MMP-9 expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 391–397, 27 mar. 2012.

KIM, T. H. et al. Activated AKT Pathway Promotes Establishment of Endometriosis. **Endocrinology**, v. 155, n. 5, p. 1921–1930, maio 2014.

KIM, M. K. et al. Ginsenoside Rg3 Decreases Fibrotic and Invasive Nature of Endometriosis by Modulating miRNA-27b: In Vitro and In Vivo Studies. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 17670, 15 dez. 2017a.

KIM J.H. et al. Anti-Endometriotic Effects of Pueraria Flower Extract in Human Endometriotic Cells and Mice. **Nutrients**, v. 9, n. 3, fev, 2017b.

KINGHORN, A. D. et al. The classical drug discovery approach to defining bioactive constituents of botanicals. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 71–79, jan. 2011.

KLAGSBRUN, M.; D'AMORE, P. A. Regulators of angiogenesis. **Annual review of physiology**, v. 53, p. 217–239, 1991.

KOBAYASHI, H. et al. Risk of developing ovarian cancer among women with ovarian endometrioma: a cohort study in Shizuoka, Japan. **International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society**, v. 17, n. 1, p. 37–43, fev. 2007.

KOCH A.E.; POLVERINI P.J.; KUNKEL S.L. et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science.*, v. 258, n. 5089, p. 1798-1801, 1992.

KOGA, K. Recurrence of ovarian endometrioma after laparoscopic excision. **Human Reproduction**, v. 21, n. 8, p. 2171–2174, 9 maio 2006.

KRISHNAMOORTHY, K.; DECHERNEY, A. H. Genetics of Endometriosis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 60, n. 3, p. 531–538, set. 2017.

KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N. *Robins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das doenças*, 7. ed. São Paulo: **Elsevier**, 2005.

KUMAR, S. et al. Prognostic analysis of ovarian cancer associated with endometriosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 204, n. 1, p. 63.e1-7, jan. 2011.

LASCHKE, M. W.; MENGER, M. D. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. **Human reproduction update**, v. 13, n. 4, p. 331–342, ago. 2007a.

LASCHKE, M. W. et al. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by down-regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 1, p. 163–171, jan. 2007b.

LASCHKE, M. W.; MENGER, M. D. Anti-angiogenic treatment strategies for the therapy of endometriosis. **Human reproduction update**, v. 18, n. 6, p. 682–702, dez. 2012.

LASCHKE, M. W.; MENGER, M. D. Basic mechanisms of vascularization in endometriosis and their clinical implications. **Human Reproduction Update**, 25 jan. 2018.

LICHTENTHÄLER, R.; RODRIGUES, R. B.; MAIA, J. G. S. et al. Total Oxidant Scavenging Capacities of *Euterpe Oleracea Mart.* (Açaí) Fruits. **Int J Food Sci Nutr**, v. 56, n 1, p 53-64, 2005.

LIM T.G.; LEE C. C.; DONG Z.; LEE K. W. Ginsenosides and their metabolites: a review of their pharmacological activities in the skin. **Archives of dermatological research**, v. 307, 397–403, 2015.

LIU, H. et al. Correlation between matrix metalloproteinase-9 and endometriosis. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 10, p. 13399–13404, 2015.

LUISI, S. et al. Serum markers for the noninvasive diagnosis of endometriosis. **Women's health (London, England)**, v. 11, n. 5, p. 603–610, ago. 2015.

MACER, M. L.; TAYLOR, H. S. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, v. 39, n. 4, p. 535–549, 2012.

MACHADO D. E. et al. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. **Fertility and sterility**, v. 90, n. 1, p. 148–155, jul. 2008.

MACHADO, D. E. et al. Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, v. 29, p. 4, 19 jan. 2010a.

MACHADO, D. E. et al. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. **Fertility and sterility**, v. 93, n. 8, p. 2674–2679, 15 maio 2010b.

MACHADO, D. E. et al. A GFP endometriosis model reveals important morphological characteristics of the angiogenic process that govern benign and malignant diseases. **Histology and histopathology**, v. 29, n. 7, p. 903–912, jul. 2014.

MACHADO, D. E. et al. Developing a Noninvasive Procedure Using Labeled Monoclonal Antibody Anti-VEGF (Bevacizumab) for Detection of Endometriosis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 751460, 2015.

MACHADO, D. E. et al. Euterpe oleracea Extract (Açaí) Is a Promising Novel Pharmacological Therapeutic Treatment for Experimental Endometriosis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0166059, 16 nov. 2016.

MAIA, H. J. et al. Role of inflammation and aromatase expression in the eutopic endometrium and its relationship with the development of endometriosis. **Women's health (London, England)**, v. 8, n. 6, p. 647–658, nov. 2012.

MARQUES, E. S. et al. Evaluation of the genotoxicity of Euterpe oleraceae Mart. (Arecaceae) fruit oil (acai), in mammalian cells in vivo. **Food and chemical toxicology**, v. 93, p. 13–19, jul. 2016.

MATHEUS, M. E. et al. Inhibitory effects of Euterpe oleracea Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. **Journal of ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 291–296, 19 set. 2006.

MATSUZAKI, S. et al. Cyclooxygenase-2 expression in deep endometriosis and matched eutopic endometrium. **Fertility and sterility**, v. 82, n. 5, p. 1309–1315, nov. 2004.

MCLAREN, J. et al. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. **The Journal of clinical investigation**, v. 98, n. 2, p. 482–489, 15 jul. 1996.

MCLAREN, J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. **Human reproduction update**, v. 6, n. 1, p. 45–55, fev. 2000.

MCLAREN, J. S.; MORRIS, E.; RYMER, J. Gonadotrophin receptor hormone analogues in combination with add-back therapy: an update. **Menopause International**, v. 18, n. 2, p. 68–72, 1 jun. 2012.

MODUGNO, F. et al. Oral contraceptive use, reproductive history, and risk of epithelial ovarian cancer in women with and without endometriosis. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 191, n. 3, p. 733–740, set. 2004.

MONGE-FUENTES, V.; MUEHLMANN, L.A.; LONGO, J.P.; SILVA, J.R. et al. Photodynamic therapy mediated by acai oil (*Euterpe oleracea Martius*) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 166, p. 301–310, 2017.

MORADI M, PARKER M, SNEDDON A, et al. Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study. **BMC Womens Health**. 2014 Oct 4;14:123.

MORETTI A.L.; PINTO F.J.; CURY V. et al. Nitric oxide modulates metalloproteinase-2, collagen deposition and adhesion rate after polypropylene mesh implantation in the intra-abdominal wall. *Acta Biomater*, v. 8, n. 1, p. 108-115, 2012.

NACUL, A. P.; SPRITZER, P. M. [Current aspects on diagnosis and treatment of endometriosis]. **Revista brasileira de ginecologia e obstetricia : revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia**, v. 32, n. 6, p. 298–307, jun. 2010.

NAP, A. W. et al. Pathogenesis of endometriosis. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 18, n. 2, p. 233–244, abr. 2004.

NASCIMENTO, V. H.; LIMA, C.D.; PAIXÃO, J.T.; FREITAS, J.J. et al. Antioxidant effects of acai seed (*Euterpe oleracea*) in anorexia-cachexia syndrome induced by Walker-256 tumor. **Acta cirurgica brasileira**, v. 31, n. 9, p. 597–601, 2016.

NERI-NUMA, I. A. et al. Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Research International**, v. 103, p. 345–360, jan. 2018.

NEZHAT, F. et al. The relationship of endometriosis and ovarian malignancy: a review. **Fertility and sterility**, v. 90, n. 5, p. 1559–1570, nov. 2008.

NNOAHAM, K. E. et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 2, p. 366–373.e8, ago. 2011.

OKADA, H. et al. Regulation of decidualization and angiogenesis in the human endometrium: mini review. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 40, n. 5, p. 1180–1187, maio 2014.

OLIVARES, C. et al. Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 23, n. 12, p. 2701–2708, dez. 2008.

OLIVARES, C. N. et al. Anastrozole and celecoxib for endometriosis treatment, good to keep them apart? **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 145, n. 2, p. 119–126, fev. 2013.

OOSTERLYNCK, D. J. et al. The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 58, n. 2, p. 290–295, ago. 1992.

OTA, H.; TANAKA, T. [Eutopic and ectopic endometrium in endometriosis]. **Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine**, v. 59 Suppl 1, p. 37–43, jan. 2001.

OWEN J.L.; MOHAMADZADEH M. Macrophages and chemokines as mediators of angiogenesis. **Front Physiol.**, v. 4, p. 159, 2013

OZKAN, S.; MURK, W.; ARICI, A. Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1127, p. 92–100, abr. 2008.

PARAZZINI, F. et al. Epidemiology of endometriosis and its comorbidities. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, 30 abr. 2016.

PAVONE, M. E.; LYTTLE, B. M. Endometriosis and ovarian cancer: links, risks, and challenges faced. **International journal of women's health**, v. 7, p. 663–672, 2015.

PERINI, J.A.; CARDOSO, J.V.; BERARDO, P.T.; et al. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms ($-2578C > A$, $-460 T > C$, $-1154G > A$, $+405G > C$ and $+936C > T$) in endometriosis: a case-control study with Brazilians. **BMC Womens Health**, v. 14, p. 117, 2014.

PILLET M.C. et al. Deep infiltrating endometriosis is associated with markedly lower body mass index: a 476 case-control study. **Human Reproduction**, v. 27, n. 1, p. 265–272, 1 jan. 2012.

PODGAEC, S. et al. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 22, n. 5, p. 1373–1379, maio 2007.

POPIVANOVA, B.K.; KITAMURA, K.; WU, Y.; KONDO, T. et al. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. **J Clin Invest**, v. 118, n. 2, p. 560-570, 2008.

POULOSE, S. M. et al. Anthocyanin-rich Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Fruit Pulp Fractions Attenuate Inflammatory Stress Signaling in Mouse Brain BV-2 Microglial Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 1084–1093, fev. 2012.

PRENTICE, A. Regular review: Endometriosis. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 323, n. 7304, p. 93–95, 14 jul. 2001.

PRUDENTE A.; RICCETTO CL.; SIMOES MM. et al. Impregnation of implantable polypropylene mesh with S-nitrosoglutathione-loaded poly(vinyl alcohol). *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 108. p. 108-178, 2013.

RAHMIOGLU, N.; MONTGOMERY, G. W.; ZONDERVAN, K. T. Genetics of endometriosis. **Women's health (London, England)**, v. 11, n. 5, p. 577–586, ago. 2015.

RAKHILA, H. et al. Augmented Angiogenic Factors Expression via FP Signaling Pathways in Peritoneal Endometriosis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 101, n. 12, p. 4752–4763, dez. 2016.

RIBEIRO J. C. et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 695, n. 1–2, p. 22–28, jan. 2010.

ROCHA A. P. M. et al. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vascular pharmacology**, v. 46, n. 2, p. 97–104, fev. 2007.

ROCHA A.L.L.; Reis F.M.; Taylor R.N. Angiogenesis and Endometriosis. **Obstet Gynecol Int.** 2013; 2013:859619.

RUAN, Y.-Q.; LIANG, W.-G.; HUANG, S.-H. Analysis of laparoscopy on endometriosis patients with high expression of CA125. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 19, n. 8, p. 1334–1337, abr. 2015.

RUHLAND, B. et al. Innovations in conservative endometriosis treatment: an updated review. **Minerva ginecologica**, v. 63, n. 3, p. 247–259, jun. 2011.

SALTAN, G. et al. *Viburnum opulus* L.: A remedy for the treatment of endometriosis demonstrated by rat model of surgically-induced endometriosis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 193, p. 450–455, 4 dez. 2016.

SAMPSON, J. A. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. **The American journal of pathology**, v. 3, n. 2, p. 93–110.43, 1927.

SANTOS, R.A., TAKAHASHI, C.S. Anticlastogenic and antigenotoxic effects of selenomethionine on doxorubicin-induced damage in vitro in human lymphocytes. *Food Chem Toxicol.*, v. 46, n. 2, p. 671-677, 2008.

SARITHA V.N.; VEENA V.S.; JAGATHNATH K.M. et al. Significance of DNA Replication Licensing Proteins (MCM2, MCM5 and CDC6), p16 and p63 as Markers of Premalignant Lesions of the Uterine Cervix: Its Usefulness to Predict Malignant Potential. *Asian Pac J Cancer Prev.*, v. 19, n. 1, p. 141-148, 2018.

SCHAUSS, A. G. et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8604–8610, 1 nov. 2006a.

SCHAUSS, A. G. et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8598–8603, 1 nov. 2006b.

SCHAUSS, A. G. et al. Safety evaluation of an acai-fortified fruit and berry functional juice beverage (MonaVie Active((R))). **Toxicology**, v. 278, n. 1, p. 46–54, 28 nov. 2010.

SCHLAFF, W. D. et al. Subcutaneous injection of depot medroxyprogesterone acetate compared with leuprolide acetate in the treatment of endometriosis-associated pain. **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 2, p. 314–325, fev. 2006.

SCHRAGER, S.; FALLERONI, J.; EDGOOSE, J. Evaluation and treatment of endometriosis. **American family physician**, v. 87, n. 2, p. 107–113, 15 jan. 2013.

SCHOLLAERT K.L.; STEPHENS M.R.; GRAY J.K.; FULKERSON P.C. Generation of eosinophils from cryopreserved murine bone marrow cells. *PLoS One.*, v. 9, n. 12, e116141, 2014.

SELAK, V. et al. Danazol for pelvic pain associated with endometriosis. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 4, p. CD000068, 17 out. 2007.

SEO, S. K. et al. Expression and possible role of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 (NAG-1) in the human endometrium and endometriosis. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 25, n. 12, p. 3043–3049, dez. 2010.

SHAHBAZI, S.; SHAHRABI-FARAHANI, M. Evaluation of the correlation between body mass index and endometriosis among Iranian fertile women. **Gynecological Endocrinology**, v. 32, n. 2, p. 157–160, fev. 2016.

SHAH, D. K. et al. Body size and endometriosis: results from 20 years of follow-up within the Nurses' Health Study II prospective cohort. **Human Reproduction**, v. 28, n. 7, p. 1783–1792, jul. 2013.

SHI X., RAN L.; LIU Y. et al. Knockdown of hnRNP A2/B1 inhibits cell proliferation, invasion and cell cycle triggering apoptosis in cervical cancer via PI3K/AKT signaling pathway. *Oncol Rep.*, v. 39, n. 3, p. 939-950, 2018.

SIKORA, J.; MIELCZAREK-PALACZ, A.; KONDERA-ANASZ, Z. Association of the Precursor of Interleukin-1beta and Peritoneal Inflammation-Role in Pathogenesis of Endometriosis. *Journal of clinical laboratory analysis*, v. 30, n. 6, p. 831–837, nov. 2016.

SILVA, D. F.; VIDAL, F. C.; SANTOS, D.; COSTA, M. C. et al. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. *BMC Complement Altern Med*, v. 14, n. 1, p. 175, 2014.

SIMOENS, S. et al. The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Human reproduction (Oxford, England)*, v. 27, n. 5, p. 1292–1299, 2012.

SIMPSON ER. Role of aromatase in sex steroid action. *J Mol Endocrinol* 2000 Oct;25(2):149-56.

SINAI, N. et al. Differences in characteristics among 1,000 women with endometriosis based on extent of disease. *Fertility and sterility*, v. 89, n. 3, p. 538–545, mar. 2008.

SOARES, S. R. et al. Pharmacologic therapies in endometriosis: a systematic review. *Fertility and sterility*, v. 98, n. 3, p. 529–555, set. 2012.

SOLIMAN, A. M. et al. The direct and indirect costs associated with endometriosis: a systematic literature review. *Human reproduction.*, v. 31, n. 4, p. 712–722, abr. 2016.

SONG S.; WANG B.; GU S. et al. Expression of Beclin 1 and Bcl-2 in pancreatic neoplasms and its effect on pancreatic ductal adenocarcinoma prognosis. *Oncol Lett.*, v. 14, n. 6, p. 7849-7861, 2017.

SOYSAL, S. et al. The effects of post-surgical administration of goserelin plus anastrozole compared to goserelin alone in patients with severe endometriosis: a prospective randomized trial. *Human reproduction (Oxford, England)*, v. 19, n. 1, p. 160–167, jan. 2004.

SPIGOLON, D. N.; MORO, C. M. C. [Essential data set's archetypes for nursing care of endometriosis patients]. *Revista gaucha de enfermagem*, v. 33, n. 4, p. 22–32, dez. 2012.

STONER, G. D. et al. Multiple berry types prevent N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats. *Pharmaceutical research*, v. 27, n. 6, p. 1138–1145, jun. 2010.

STROWITZKI, T. et al. Safety and tolerability of dienogest in endometriosis: pooled analysis from the European clinical study program. **International journal of women's health**, v. 7, p. 393–401, 2015.

SUDO, R. T. et al. Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract from *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) in a rodent model of acute and neuropathic pain. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, dez. 2015.

SURREY, E. S. et al. Effect of prolonged gonadotropin-releasing hormone agonist therapy on the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer in patients with endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 78, n. 4, p. 699–704, out. 2002.

SWARNAKAR, S.; PAUL, S. Curcumin arrests endometriosis by downregulation of matrix metalloproteinase-9 activity. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 46, n. 1, p. 59–65, fev. 2009.

TAKENAKA, Y. et al. Lipopolysaccharide promoted proliferation and invasion of endometriotic stromal cells via induction of cyclooxygenase-2 expression. **Fertility and sterility**, v. 93, n. 1, p. 325–327, jan. 2010.

TOSTI, C. et al. Hormonal therapy for endometriosis: from molecular research to bedside. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v. 209, p. 61–66, fev. 2017.

ULBRICHT, C. et al. An evidence-based systematic review of acai (*Euterpe oleracea*) by the Natural Standard Research Collaboration. **Journal of dietary supplements**, v. 9, n. 2, p. 128–147, jun. 2012.

VERCELLINI, P. et al. Association between endometriosis stage, lesion type, patient characteristics and severity of pelvic pain symptoms: a multivariate analysis of over 1000 patients. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 22, n. 1, p. 266–271, jan. 2007.

VERCELLINI, P.; SOMIGLIANA, E.; VIGANO, P.; ABBIATI, A. et al. Endometriosis: current and future medical therapies. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*, v. 22, n. 2, p. 275–306, nov. 2008.

VERCELLINI, P. et al. Repetitive surgery for recurrent symptomatic endometriosis: what to do? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, v. 146, n. 1, p. 15–21, 2009a.

VERCELLINI, P. et al. The effect of surgery for symptomatic endometriosis: the other side of the story. **Human reproduction update**, v. 15, n. 2, p. 177–188, 2009b.

VERCELLINI, P. et al. “Waiting for Godot”: a commonsense approach to the medical treatment of endometriosis. **Human Reproduction**, v. 26, n. 1, p. 3–13, jan. 2011.

VERCELLINI, P. et al. Endometriosis: pathogenesis and treatment. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 10, n. 5, p. 261–275, maio 2014.

VERIT, F. F.; YUCEL, O. Endometriosis, leiomyoma and adenomyosis: the risk of gynecologic malignancy. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 14, n. 10, p. 5589–5597, 2013.

VERNON, M. W.; WILSON, E. A. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. **Fertility and sterility**, v. 44, n. 5, p. 684–694, nov. 1985.

VETTERLEIN M.W.; ROSCHINSKI J.; GILD P. et al. Impact of the Ki-67 labeling index and p53 expression status on disease-free survival in pT1 urothelial carcinoma of the bladder. *Transl Androl Urol.*, v. 6, n. 6, p. 1018-1026, 2017.

VIGANO, P. et al. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 18, n. 2, p. 177–200, abr. 2004.

WANG, C. C. et al. Prodrug of green tea epigallocatechin-3-gallate (Pro-EGCG) as a potent anti-angiogenesis agent for endometriosis in mice. **Angiogenesis**, v. 16, n. 1, p. 59–69, jan. 2013.

WANG, D. et al. DNA hypomethylation of the COX-2 gene promoter is associated with up-regulation of its mRNA expression in eutopic endometrium of endometriosis. **European Journal of Medical Research**, v. 17, p. 12, 18 maio 2012.

WANG, Y. et al. Involvement of breast cancer stem cells in tumor angiogenesis. **Oncology Letters**, v. 14, n. 6, p. 8150–8155, dez. 2017.

WU, M.-H. et al. Endometriosis: disease pathophysiology and the role of prostaglandins. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 9, n. 2, p. 1–20, 16 jan. 2007.

YADAV, L. et al. Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, v. 9, n. 6, p. XE01-XE05, jun. 2015.

YAMAGUCHI, K. K. DE L. et al. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137–151, jul. 2015.

YE, M. et al. [Relationship between endometriosis stage, characteristics of endometriotic lesions and severity of dysmenorrhoea]. **Zhonghua yi xue za zhi**, v. 95, n. 9, p. 685–688, 10 mar. 2015.

ZITO, G. et al. Medical Treatments for Endometriosis-Associated Pelvic Pain. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–12, 2014.

10. ANEXOS**ANEXO I**

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste – UEXO
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEXO)



Parecer nº 009

Pesquisador Responsável: Prof. Daniel Escorsim Machado

Tipo de Pesquisa: Pesquisa, Extensão/Treinamento.

Instituição onde será desenvolvido: UEXO e UFRJ

Situação: **APROVADO**

Ao analisar o projeto de pesquisa: “Estabelecimento de modelo experimental de endometriose peritoneal.”, considero que o projeto se encontra adequado e satisfatório de acordo com as exigências das Resoluções que regem esta Comissão.

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sou de parecer favorável a realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais da Norma de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão da Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste.

Rio de Janeiro, 06 de novembro de 2014

Prof. Michel Alexandre Villani Gantus

Coordenador da CEUA-UEXO