

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

MARIA RAQUEL UNTERKIRCHER GALHEIGO

CARCINOGENESE DA PRÓSTATA DE CAMUNDONGOS: PAPEL DO  
RECEPTOR TIPO I DO TNF- $\alpha$  NA INCIDÊNCIA TUMORAL

UBERLÂNDIA  
2015

MARIA RAQUEL UNTERKIRCHER GALHEIGO

CARCINOGENESE DA PRÓSTATA DE CAMUNDONGOS: PAPEL DO  
RECEPTOR TIPO I DO TNF- $\alpha$  NA INCIDÊNCIA TUMORAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador(a): Profa. Dra. Daniele Lisboa Ribeiro

UBERLÂNDIA  
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

G155c  
2015 Galheigo, Maria Raquel Unterkircher,  
Carcinogênese da próstata de camundongos: papel do receptor tipo I  
do TNF- $\alpha$  na incidência tumoral / Maria Raquel Unterkircher Galheigo. -  
2015.

55 f. : il.

Orientadora: Daniele Lisboa Ribeiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.  
Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Próstata - Câncer - Teses. 3. Citocinas -  
Teses. I. Ribeiro, Daniele Lisboa. II. Universidade Federal de  
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Estrutural Aplicadas. III. Título.

---

CDU: 581

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui. Em especial, aos meus pais, minhas irmãs e ao meu namorado.



## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, por sempre me incentivarem nas minhas escolhas, por me fazerem acreditar na minha capacidade e pelo apoio, inclusive financeiro, não permitindo que eu desistisse dos meus objetivos.

À professora Daniele, agradeço pela oportunidade de poder fazer parte desse projeto; pelas palavras de incentivo; e por ter se mostrado sempre disponível não só para me ensinar e passar um pouco da sua experiência, mas também para me ajudar diante das minhas dificuldades.

Aos profs. Dr Sebastião Roberto Taboga e Dra. Silvana Gisele Pegorin de Campos, que compuseram a banca avaliadora, pela gentileza em contribuir com o aprimoramento do trabalho.

Ao meu namorado, Guilherme, pela companhia, pelas ajudas, pelos conselhos, por me ouvir sempre, e, principalmente, pela paciência nos 2 últimos anos.

À Amandinha, por ter dividido comigo grande parte dessa fase, me ajudando nos experimentos, ouvindo minhas lamentações e frustrações, me dando conselhos, e sempre me fazendo rir.

Aos colaboradores do projeto: ao prof. Dr. Renato Simões Cordeiro pelo auxílio nos cortes seriados e ao prof. Paulo Rogério e Bianca Facchim, pelo auxílio na identificação e classificação das lesões.

Ao prof. Sebastião Roberto Taboga, por ter permitido a utilização do escâner de lâminas do seu laboratório, e também a todos do laboratório pela recepção e auxílio, principalmente aos prof. Dr. Ricardo Fochi e à profa. Dra. Maria Etelvina Pinto Fochi, que me ensinaram a utilizar o equipamento, se mostrando extremamente prestativos.

Mais uma vez à profa. Dra. Maria Etelvina, pela realização da dosagem de TNF, permitindo que colocássemos esses dados em nosso trabalho.

Ao professor Dr. Marcelo Silva e às alunas Flávia Sayuri e Talita Vieta pela disposição em me ensinar e auxiliar na metodologia de PCR.

Aos técnicos do laboratório de Histologia, Estér e Fabrício, por estarem sempre disponíveis em ajudar, tirando dúvidas sobre algumas técnicas e fornecendo material.

À amiga Ana Flávia, por ceder gentilmente uma alíquota do anticorpo MMP2 utilizado nesse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos a todos!

Maria Raquel

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

(Madre Teresa de Calcutá)

## RESUMO

O TNF- $\alpha$  é uma das principais citocinas envolvidas com o processo de carcinogênese, inclusive da próstata, sendo o TNFR-1 o receptor responsável pela maioria das suas respostas. Esse receptor desencadeia duas vias opostas: morte ou sobrevivência celular. Assim, devido a esse seu papel paradoxal, um modelo de *knockout* de TNFR-1 é interessante para esclarecer de forma mais específica o real efeito do TNF no câncer de próstata. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo geral avaliar o papel da via de sinalização TNF- $\alpha$  na carcinogênese através da indução química do câncer de próstata em camundongos. Para tanto, camundongos C57bl/6 selvagens (WT) e *knockout* (KO) para o receptor TNFR-1 foram tratados com óleo mineral ou MNU associado a testosterona (MNU+T) durante o período de 6 meses. Após esse período de indução, observou-se que o tratamento com MNU+T levou ao desenvolvimento de lesões benignas e malignas em ambos animais WT e KO. Entretanto, a incidência de lesões malignas foi significativamente maior no primeiro grupo, indicando o envolvimento do TNFR-1 com a via de sobrevivência, proliferação celular e, assim, com a carcinogênese prostática. Esses dados foram reforçados pelas análises do perfil proliferativo das células, os quais mostraram que a proliferação foi substancialmente menor em KO, mesmo após a carcinogênese. Além disso, os animais KO apresentaram menores quantidades de mTOR após o tratamento com MNU+T, ao contrário do observado em WT, evidenciando o potencial de TNFR-1 em ativar a via que leva à fosforilação dessa proteína. Observou-se ainda uma queda nas quantidades de AR após o período de tratamento com carcinógeno tanto nos animais KO quanto nos WT. Devido ao fator de a expressão desse receptor poder ser regulada como resultado da ativação da via PI3K/AKT/mTOR, sugere-se que a diminuição de AR possa ter ocorrido como consequência da menor quantidade de mTOR nesses animais. Sugere-se ainda que a via TNF- $\alpha$  /TNFR-1 tenha papel fundamental na expressão de MMP2, reduzindo seu conteúdo na sua ausência, e que a diminuição da mesma pode ter relação com o aumento de fibronectina em KO. Por fim, foi observado um aumento da apoptose de maneira igual no grupo WT e em KO após o tratamento com MNU+T, deixando evidente que TNFR-1, nesse modelo, não teve envolvimento com a indução da morte celular. Portanto, conclui-se que a citocina TNF- $\alpha$ , através de seu receptor TNFR-1, promoveu proliferação e sobrevivência celular por meio da ativação da via AKT/mTOR, o que comprova seu papel na carcinogênese da próstata nesse modelo experimental.

**Palavras chave:** TNFR-1. Carcinogênese da próstata. AKT/mTOR.

## ABSTRACT

TNF- $\alpha$  is a key cytokine involved in process of carcinogenesis, including prostate carcinogenesis, being TNFR-1 the responsible for the majority of its answers. This receptor triggers two opposite pathways: cell death or cell survival. So, due to this paradoxal role, a TNFR-1 knockout model is interesting in order to clarify the real effect of TNF in prostate cancer. Thus, this investigation had as a general propose to evaluate the role of TNF signalling pathway in prostate carcinogenesis by chemical induction in mice. Therefore, C57bl/6 wild type (WT) and TNFR-1 knockout mice (KO) were treated with mineral oil or MNU in association with testosterone (MNU+T) during 6 months. After this period of induction, prostate samples were processed for histological and biochemical analysis. It was observed that the treatment with MNU+T led to development of benign and malign lesions in both WT e KO animals. However, the incidence of malign lesions was significantly higher in the former, indicating the involvement of TNFR-1 with cellular survival and proliferation pathway. These data were supported by proliferative profile analysis, which showed that proloferation was significantly lower in KO, even after carcinogenesis. Moreover, knockout animals had smaller prostate amounts of mTOR after treatment with MNU+T in comparison to WT, suggesting the potential of TNFR-1 in activating this proliferative pathway. It was also observed a decrease in AR quantities in prostate after carcinogenesis in both KO and WT. Since AR expression may be regulated as a result of PI3K/AKT/mTOR pathway activation, it is suggested that the decrease of AR in KO may have occurred as a result of smaller quantities of mTOR in these animals. Moreover, it's suggested that TNF- $\alpha$  /TNFR-1 has key role in MMP2 expression, reducing the content of this enzyme in its absence, and that the decrease of MMP2 may be responsible to the accumulation of fibronectin in KO. Finally, it was observed a similar increase in apoptosis in WT and KO group after carcinogenesis, showing clearly that TNFR-1 in this model was not involved in the induction of cell death. Therefore, it is concluded that the cytokine TNF- $\alpha$ , through its receptor TNFR-1 promoted cell proliferation and cell survival by activation of the AKT/mTOR pathway, which implicates its role in prostate carcinogenesis in this experimental model.

**Key words:** TNFR-1. Prostate carcinogenesis. AKT/mTOR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Divisão anatômica da próstata humana e de camundongos.....	12
<b>Figura 2</b> - Esquema simplificado da sinalização do TNF- $\alpha$ para apoptose, proliferação e sobrevivência, via TNFR-1.....	19
<b>Tabela 1</b> – Dados biométricos dos camundongos selvagens e <i>knockouts</i> dos grupos controle e tratados com MNU e testosterona.....	28
<b>Tabela 2</b> - Incidência e frequência das alterações morfológicas observadas nas próstatas dorsolaterais de animais selvagem e <i>knockout</i> tratados com MNU+T.....	29
<b>Figura 3</b> – Fotomicrografias de todo o complexo prostático de camundongos selvagem e <i>knockout</i> que não passaram pela indução química da carcinogênese.....	30
<b>Figura 4</b> – Cortes histológicos da próstata dorsolateral evidenciando as lesões benignas e malignas encontradas nos animais que passaram pelo processo de carcinogênese induzida quimicamente.....	32
<b>Figura 5</b> – Fotomicrografias da próstata dorsolateral de camundongos evidenciando as lesões malignas e suas imunomarcações em cortes seriados.....	34
<b>Figura 6</b> – Fotomicrografias da próstata dorsolateral evidenciando a distribuição de colágeno, bem como imunomarcação de fibronectina e PCNA, em camundongos selvagem e <i>knockout</i> tratados ou não com carcinógeno.....	37
<b>Figura 7</b> – Gráficos das frequências relativas (%) da distribuição de colágeno e fibronectina e da quantidade e porcentagem de células proliferativas na próstata dorsolateral dos animais estudados.....	38
<b>Figura 8</b> – Western blotting para AR, MMP2 e p-mTOR na próstata de camundongos com (WT) e sem expressão de TNFR-1 (KO).....	39
<b>Figura 9</b> – Ensaio de mensuração da atividade das caspases 3 e 7 na próstata de camundongos com (WT) e sem expressão de TNFR-1 (KO).....	40
<b>Figura 10</b> – Valores da dosagem de TNF- $\alpha$ nas amostras da próstata de animais selvagem (WT) e <i>knockout</i> (KO) tratados ou não com carcinógeno.....	41
<b>Figura 11</b> - Modulação da via TNF- $\alpha$ /TNFR-1 na proliferação celular e progressão tumoral na próstata de camundongos.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Receptor de andrógeno
BSA	Albumina de soro bovino
CaP	Câncer de próstata
DHT	Di-hidrotestosterona
MEC	Matriz extracelular
MMP2	Metaloproteinase 2
MNU	N-nitroso-N-metilureia
mTOR	Alvo mamífero da rapamicina
NFκB	Fator nuclear kappa B
NIP	Neoplasia intraepitelial prostática
PBS	Tampão fosfato salina
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PSA	Antígeno específico prostático
T	Testosterona
TA	<i>Transit amplifying</i>
TBST	Tampão tris-salínico e tween 20
TNFR-1	Receptor do fator de necrose tumoral tipo 1
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

## SUMARIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
Considerações sobre o câncer de próstata.....	10
A próstata: função e estrutura .....	11
Fisiologia da próstata .....	13
Carcinogênese prostática e modelos de CaP.....	14
O TNF- $\alpha$ e sua relação com o câncer.....	17
2 JUSTIFICATIVA.....	20
3 OBJETIVOS .....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	23
Animais.....	23
Indução química da carcinogênese .....	23
Processamento das amostras .....	23
Análise morfológica.....	24
Análises imunohistoquímicas .....	25
Estudo da atividade das caspases 3 e 7 .....	26
Análise estatística .....	27
5 RESULTADOS.....	27
Dados biométricos dos animais dos grupos experimentais .....	27
Incidência e multiplicidade das lesões prostáticas .....	28
Estudo morfológico.....	29
Imunohistoquímica para caracterização das lesões malignas .....	33
Análise do perfil proliferativo .....	35
Avaliação do estroma e sua remodelação na próstata dorsolateral .....	35
Estudo da atividade das caspases 3 e 7 .....	39
Dosagem de TNF- $\alpha$ .....	40
6 DISCUSSÃO .....	41
7 CONCLUSÃO .....	47
8 REFERÊNCIAS .....	48

## 1 INTRODUÇÃO

### Considerações sobre o câncer de próstata

Dados epidemiológicos sobre o câncer de próstata (CaP), mostram diferentes taxas de incidência desse tipo de neoplasia nas diversas populações étnicas, devido, além da influência de fatores genéticos, ao estilo de vida. Em acordo com essas informações, observa-se uma incidência de CaP consideravelmente menor em países da Ásia em relação aos países da América do Norte (GRÖENBERG, 2003; DAMBER; AUS, 2008; CHEETHAM; KATZ, 2011). A grande heterogeneidade de morte por CaP entre esses lugares indica que os fatores comportamentais de dieta e estilo de vida desempenham um importante papel. Isso porque, pesquisas mostram que a incidência em indivíduos asiáticos, que é naturalmente baixa, aumenta quando esses adotam o estilo de vida ocidental (GRÖENBERG, 2003; DAMBER; AUS, 2008; CHEETHAM; KATZ, 2011).

Além da dieta, outros fatores de risco para o CaP incluem, sedentarismo, tabagismo e hereditariedade. Contudo, os dados sobre a real influência de determinados fatores de risco sobre a patogênese do CaP ainda são muito controversos. Os únicos bem estabelecidos até o momento são a idade avançada, a etnia e o histórico familiar (GRÖENBERG, 2003; JEMAL et al., 2011). O primeiro caso pode ser explicado pelo fato de que o CaP se desenvolve lentamente, e o carcinoma pode ser precedido por lesões displásicas que perduram por até décadas (LEITZMANN; ROHRMANN, 2012). Dessa forma, esse tipo de câncer pode ser considerado, mais do que qualquer outro, um câncer da terceira idade. Corroborando com essas informações, o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2015) divulgou que  $\frac{3}{4}$  do total de casos no mundo acometem homens com 65 anos ou mais. Além disso, sabe-se que essa doença acomete também em maior número indivíduos de etnia afrodescendente. Assim, alguns estudos identificaram regiões específicas de determinados cromossomos, como o locus 8q24, as quais estariam associadas à maior susceptibilidade dessas pessoas ao desenvolvimento do CaP (FREEDMAN, 2006; ZHENG et al., 2008; TINDALL et al., 2013). Ainda, não se pode descartar o histórico familiar também como um importante fator de risco para esse tipo de doença. A influência genética, a exposição a fatores ambientais comuns, ou até mesmo mutações aleatórias podem explicar a alta incidência do adenocarcinoma de próstata em indivíduos de uma mesma família (GRÖENBERG, 2003). Por fim, é importante ressaltar que doenças infecciosas e processos inflamatórios na próstata também tem sido apontados como importantes fatores envolvidos na carcinogênese prostática (NELSON et al., 2004; STRASNER e KARIN, 2015).



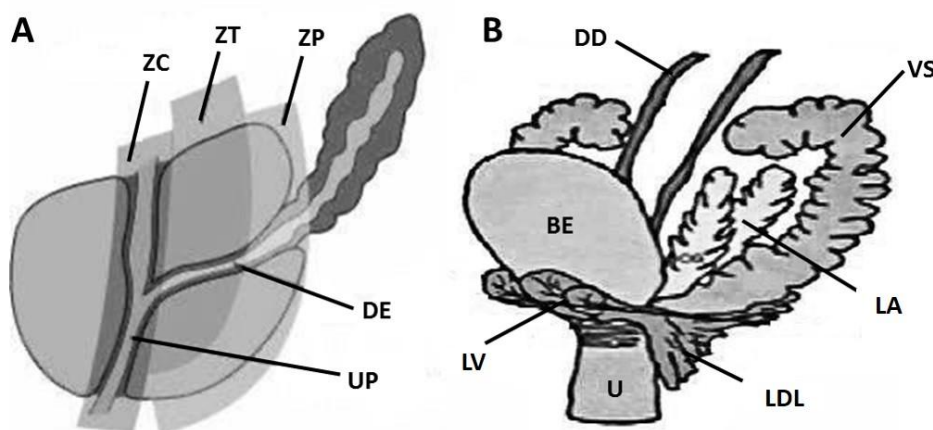
Diante disso, nota-se a grande relevância do CaP dentro do cenário da saúde pública. Em termos numéricos, de acordo com a estimativa do Ministério da Saúde para 2014 (válidas também para o ano de 2015), o CaP lidera o ranking dos cânceres mais incidentes na população brasileira (69 mil casos), perdendo apenas para o câncer de pele não melanoma (182 mil casos). A região Sul é a mais afetada (91 casos/100 mil hab.), seguida da região Sudeste (88 casos/100 mil hab.) (INCA, 2015). Da mesma forma, em outros países as estatísticas não mudam. De acordo com os dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o CaP esteve entre os 5 tipos de câncer mais diagnosticados no mundo em 2012 (WHO, 2015). Para 2015 espera-se a ocorrência de 220.800 novos casos só nos Estados Unidos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015). Com isso, nota-se que o CaP está entre as neoplasias mais frequentes no mundo (LEITZMANN; ROHRMANN, 2012).

### **A próstata: função e estrutura**

Em seres humanos, a próstata é a maior glândula acessória do sistema genital masculino (LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAUM, 2011). É constituída de trinta a cinquenta glândulas túbulo alveolares, as quais lançam seu conteúdo na uretra prostática através de ductos excretores. Tal conteúdo forma o fluido seminal, que é secretado com a função de neutralizar as substâncias vaginais ácidas, fornecer nutrientes e transporte para os espermatozoides, além de liquefazer o sêmen (KIERSZERBAUM; TRES 2012). Em humanos, a próstata é uma estrutura única, localizada entre a base da bexiga e o reto e circundando a uretra proximal. Em contrapartida, em roedores, a próstata é dividida em lobos, os quais se encontram também circundando a uretra proximal, em uma região imediatamente caudal à bexiga urinária (SUGIMURA; CUNHA; DONJACOUR, 1986).

Semelhanças funcionais e histológicas entre a próstata de camundongos e de humanos viabilizam o emprego de modelos geneticamente modificados no estudo das alterações moleculares envolvidas no desenvolvimento e progressão do CaP (SHAPPELL et al., 2004). Em ambas as espécies, a próstata é um órgão sensível a andrógenos e formada por glândulas alveolares, as quais possuem tipos de células epiteliais semelhantes e com funções equivalentes (células secretórias, basais e neuroendócrinas) (ROY-BURMAN et al., 2004; SHAPPELL et al., 2004). Além disso, observações comparativas do desenvolvimento desse órgão em humanos e roedores demonstram que a morfogênese do mesmo em ambas as espécies ocorre de maneira análoga (TIMMS; MOHS; DIDIO, 1994). Entretanto, existem algumas diferenças micro e macroanatômicas que devem ser consideradas. Nos humanos, a próstata é dividida em zonas

distintas de acordo com sua histologia, funções biológicas e susceptibilidade a desordens patológicas (McNEAL, 1988). Dessa forma, a próstata humana é composta por uma região de estroma fibromuscular anterior e pelas zonas: central, de transição e periférica (McNEAL, 1988) (Figura 1A). Por outro lado, em camundongos, a próstata é segmentada em estruturas designadas lobos anterior, ventral, dorsal e lateral (Figura 1B). Tais estruturas possuem características histológicas e funções fisiológicas distintas (LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAUM, 2011). A próstata anterior de camundongos é considerada análoga à zona central da próstata de humanos, a qual raramente é acometida por transformações neoplásicas. Ainda, a região dorsolateral da glândula de camundongos é a mais semelhante à zona de transição em humanos, de onde frequentemente se originam os carcinomas de próstata (McNEAL, 1984; XUE et al., 1997).



**Figura 1** - Divisão anatômica da próstata humana e de camundongos. A- Próstata humana: ZC – Zona Central; ZT – Zona de Transição; ZP – Zona Periférica; DE – Ducto Ejaculatório; UP – Uretra Prostática. B- Próstata de camundongo: BE – Bexiga; U – Uretra; DD – Ducto Deferente; VS – Vesícula Seminal; LV – Lobo Ventral; LDL – Lobo Dorsolateral; LA – Lobo Anterior (glândula coaguladora). Adaptado de: Pathology outlines <<http://www.pathologyoutlines.com/topic/prostatehistology.html>> Acesso em 28 out 2013 (A);SUGIMURA; CUNHA; DONJACOUR, et al., 1986 (B).

A estrutura histológica do epitélio prostático de camundongos e de humanos é composta por camadas de células secretórias luminiais, células basais e células neuroendócrinas, sendo que esse epitélio se encontra envolvido por um estroma fibromuscular (CUNHA, 1994; LONG et al., 2005). O estroma corresponde a todos os elementos celulares e extracelulares encontrados exteriormente à camada basal: células musculares lisas, fibroblastos, vasos sanguíneos, células do tecido conjuntivo, terminais nervosos e matriz extracelular rica em colágeno (CUNHA et al., 1987).

As células luminiais formam um epitélio de revestimento colunar simples, cuja taxa de proliferação é muito baixa, e expressam altos níveis de receptores de andrógenos (AR). Elas se

diferenciam com a função primária de sintetizar parte do fluido seminal, através da produção do antígeno específico prostático (PSA), da fosfatase ácida prostática (PAP), dentre outras proteínas (McNEAL, 1988; HUDSON, 2003). Ainda, apoiada a essa, existem as células basais, as quais, em contrapartida, possuem maior taxa de proliferação, não possuem perfil secretório e não expressam ARs (BONKHOF; STEIN; REMBERGER, 1994). Acredita-se que na camada basal existam populações de células tronco com capacidade de dar origem a células secretórias da camada luminal através de um fenótipo intermediário, denominado *transit amplifying* (TA) que posteriormente se diferenciara nas células luminiais secretoras (ISAACS; COFFEY, 1989). Uma peculiaridade característica da próstata de humanos é que a camada de células basais é contínua, ao passo que em camundongos essas células são mais escassas, tornando uma camada descontínua (MARKER et al., 2003).

### **Fisiologia da próstata**

A próstata é uma glândula cujo desenvolvimento e função são extremamente dependentes de hormônios, principalmente dos andrógenos (CULIG et al., 2002). Além disso, a homeostase prostática é muito sensível também a estrógenos, uma vez que esses hormônios podem exercer efeitos diretos e indiretos na diferenciação e proliferação das células epiteliais (CUNHA et al., 2001; HÄRKÖNEN; MÄKELÄ, 2004; ZANATELLI et al., 2014). Sendo assim, sugere-se que o desequilíbrio em seus níveis possa afetar o crescimento normal da glândula (HÄRKÖNEN; MÄKELÄ, 2004; McPHERSON et al., 2007). Ainda, é importante ressaltar que outros hormônios, tais como a prolactina, a progesterona, insulina e os glicocorticoides, também participam do controle da fisiologia da próstata (CUNHA et al., 1987; RIBEIRO et al., 2008; RIBEIRO et al., 2012; FOCHI et al., 2013).

A testosterona (T) é o principal andrógeno circulante no organismo masculino. Esse hormônio é produzido em maior quantidade pelas células de Leydig, nos testículos, as quais são reguladas e ativadas pelo hormônio luteinizante (LH), que, por sua vez, é sintetizado e secretado pela hipófise. Ademais, a T também é produzida, porém em menor escala, pelas glândulas adrenais (DUFAU, 1988; HIIPAKKA; LIAO, 1998). Então, a T pode ser metabolizada em estradiol pela atividade da enzima aromatase ou reduzida à dihidrotestosterona (DHT) nas células dos órgãos sexuais, como ocorre na próstata (BRUCHOVSKY; WILSON, 1968; KANG et al., 2003). A DHT é o andrógeno mais ativo na próstata, uma vez que possui maior afinidade aos ARs (DESLYPERE, 1992). O fenômeno de redução da T à DHT ocorre por meio da ação da enzima 5 $\alpha$ -redutase, a qual existe sob a forma

de duas isoenzimas: 5 $\alpha$ -redutase tipo 1 e tipo 2. Ambas possuem diferentes propriedades bioquímicas e padrões de expressão, sendo que a segunda é a mais abundante nas células luminais e no estroma da próstata (THIGPEN et al., 1993; RUSSEL; WILSON, 1994).

As funções da T ou da DHT são desempenhadas através da associação das mesmas ao AR no núcleo celular. O AR é um membro da superfamília dos receptores nucleares, os quais agem como fatores de transcrição induzidos por ligantes, mediando a expressão de genes alvos (KANG et al., 2003). Dessa forma, por meio da modulação da expressão e atividade de reguladores do ciclo celular, os andrógenos dirigem o desenvolvimento prostático através do controle da proliferação e diferenciação das células epiteliais (CUNHA et al., 1987). Os ARs estão presentes nas células do epitélio e do estroma da próstata. Em condições fisiológicas normais, a secreção das células epiteliais é estimulada diretamente pela ligação dos andrógenos aos receptores das mesmas. Assim, a ação direta dos receptores de andrógeno nas células epiteliais resulta na diferenciação das células do epitélio luminal e regula a transcrição de produtos protéicos que são requeridos para a função secretora da próstata, tais como o PSA (LONG et al., 2005). Já a proliferação no epitélio acinar é indiretamente controlada via estimulação androgênica de células estromais, que secretam fatores de crescimento tais como EGF, FGF-7, FGF-10 e IGF-1. Essas moléculas, denominadas andromedinas, atuam no epitélio, ativando a proliferação de TA, sendo também essenciais para a sobrevivência de células luminais (UZGARE; ISAACS, 2005). Esse mecanismo, que ocorre desde o desenvolvimento embrionário até a vida adulta, é chamado de interação epitélio-estroma e é fundamental para o homeostase glandular.

### **Carcinogênese prostática e modelos de CaP**

O CaP é fenotipicamente e genotipicamente heterogêneo, ou seja, é constituído de células com características fenotípicas e potenciais proliferativos e malignos distintos um dos outros (HEPPNER, 1984; NOWELL, 1986). Tal heterogeneidade deve ser consequência de mutações nos diferentes tipos de células que compõem essa glândula (células basais, TA ou células luminais), resultando em diversas vias de mutação (UZGARE, ISAACS, 2005). Sendo assim, os dados a respeito da origem e transformação maligna do tumor de próstata ainda são muito controversos.

Paralelamente, sabe-se que os esteróides sexuais desempenham um importante papel na carcinogênese prostática e, portanto, o CaP é conhecido como um tipo tumoral, que, em um primeiro momento, é dependente de andrógenos, uma vez que a remoção dos mesmos promove

o aumento da morte celular e a diminuição da atividade proliferativa, sendo, inclusive, uma boa alternativa terapêutica (AGUS et al., 1999; WANG et al., 2001). Porém, cabe ressaltar aqui, que a privação hormonal (a qual é considerada tratamento padrão do CaP) muitas vezes leva ao surgimento de tumores mais severos, o que pode ser explicado pelo fato de as células basais e/ou tronco não expressarem ARs e, portanto, serem independentes da ação de andrógenos. Sendo assim, elas passam a ser resistentes a esse tipo de tratamento, permanecendo viáveis para retomar a proliferação tumoral numa etapa posterior à ablação androgênica (TU e LIN, 2012). Além dos andrógenos, o estrógeno também tem sido relacionado com a carcinogênese da próstata. Estudos mostraram que o tratamento de camundongos, ratos e células humanas com estradiol-17 $\beta$  (um estrógeno) em combinação com a T foi capaz de induzir o CaP nesses modelos (NOBLE, 1977; WANG et al., 2000; RICKE et al., 2006).

Ainda no contexto da carcinogênese, sabe-se que o estroma desempenha papel essencial nesse processo maligno, fornecendo um microambiente que estimularia eventos posteriores como a proliferação celular, angiogênese e invasão tumoral. Além disso, também já foi observado que fatores sintetizados e secretados pelas células estromais da próstata, tais como fatores de crescimento produzidos por fibroblastos, mostraram estimular a progressão do câncer nessa glândula (THOMPSON et al., 1993; OLUMI et al., 1999). Ademais, alterações bioquímicas e histológicas tem sido observadas no estroma tumoral, que comumente é designado como estroma reativo (RICKE et al., 2006). Tais mudanças estromais incluem a maior expressão de colágeno e fibronectina, além de maior atividade de metaloproteinases associada à angiogênese aumentada, influxo de células inflamatórias e maior biodisponibilidade de fatores de crescimento (TUXHORN, AYALA, ROWLEY, 2001). Portanto, o estroma reativo assume importante papel na mediação da carcinogênese do CaP.

Os modelos animais para o CaP são extremamente necessários uma vez que o estudo do seu desenvolvimento e progressão é pouco viável em humanos. Isso decorre do fato dele ser uma neoplasia que se desenvolve lentamente, podendo levar décadas para o surgimento de lesões malignas (LEITZMANN; ROHRMANN, 2012). Sendo assim, torna-se difícil o acesso às amostras humanas das fases iniciais do desenvolvimento do câncer, já que o CaP clinicamente detectável surge após longos períodos de latência (ABATE-SHEN; SHEN, 2002). Somado a isso, por essa doença ser de natureza heterogênea e multicausal, a sua carcinogênese é um processo extremamente complexo, o qual reflete aspectos genéticos e ambientais que resultam em uma série de processos químicos e interações celulares (DE MARZO, 2007). Diante desses fatores, diversos modelos experimentais tem surgido para a pesquisa científica de CaP.

Uma das ferramentas de estudos utilizadas pelos pesquisadores para investigar os processos envolvidos no CaP é a cultura de células. De acordo com a literatura, as três linhagens celulares mais empregadas nas pesquisas são PC-3, LNCaP e DU145 (SOBEL; SADAR, 2005). As culturas celulares também podem ser empregadas em associação a modelos animais (modelos xenográficos), através de injeções ou implantes, permitindo o estudo das interações entre essas células e o organismo (GINGRICH et al., 1996). Como nos modelos xenográficos os animais são imunodeficientes, ao mesmo tempo que permite o crescimento de enxertos, também levanta dúvidas sobre o quão fiel à realidade é a progressão tumoral nesse modelo. Isso porque a interação entre as células imunes e as células tumorais desempenha um importante papel durante a carcinogênese e metástase do CaP humano (VALKENBURG; WILLIAMS, 2011). Além disso, tanto os estudos *in vitro* quanto os transplantes de células em roedores não retratam de maneira tão próxima do real as várias interações entre os compartimentos celulares, teciduais e hormonais, uma vez que ambas as formas não representam a carcinogênese tal qual ela ocorre dentro do organismo (HUSS; MADDISON; GREENBERG, 2001). Assim, modelos de carcinogênese desenvolvida nos próprios animais possibilitam a mimetização do ambiente cancerígeno *in vivo*, de maneira que os mecanismos moleculares possam ser investigados e analisados, permitindo, dessa forma, o estudo de novas terapias (TROIANI et al., 2008).

Através de ferramentas de engenharia genética, foram criadas experimentalmente algumas categorias de modelos de camundongos para o desenvolvimento de CaP. As principais são: os modelos xenográficos (já abordados), a ampla classe dos camundongos geneticamente modificados (sigla em inglês: “GEMs”) \_a qual inclui os modelos transgênicos que expressam diferentes oncogenes, tais como o camundongo TRAMP\_ e os modelos de *knockouts* tradicionais e condicionais (VALKENBURG; WILLIAMS, 2011).

Ainda, uma outra maneira de se conseguir o desenvolvimento de tumores em roedores é a indução química. Quatro compostos químicos com efeitos genotóxicos são empregados na pesquisa a fim de induzir o CaP: o N-nitroso-N-metilureia (MNU), o N-nitrosobis (2-oxopropil) amino (BOP), o 3,2'-dimetil-4-amino-bifenil (DMAB) e o 2-amino-1-metil-6-fenil-imidazo[4,5-b] piridina (PhIP) (SHIRAI et al., 2000), sendo o MNU aquele descrito com maior sucesso na alta incidência tumoral. De acordo com Bosland (1992), o tratamento baseado apenas no agente químico MNU causa baixa incidência de CaP, assim como o tratamento isolado com T tem longo período para o desenvolvimento tumoral. Entretanto, esse mesmo estudo mostra que, quando associados, os dois compostos aumentam consideravelmente a incidência de câncer nos animais tratados. O MNU é um agente metilante de DNA altamente genotóxico e seu efeito é potencializado pela administração de T uma vez que esse hormônio

estimula a proliferação celular. Dentro desse contexto, vários trabalhos em ratos e gerbilos apontam o sucesso da indução de CaP através do tratamento dos animais com o MNU associado à testosterona. Essas investigações mostram um período de indução de 12 a 24 semanas com sucesso no desenvolvimento de lesões malignas (GONÇALVES et al., 2010; GONÇALVES et al., 2013; SHARMILA et al., 2014; PEIXOTO et al., 2015). Já para camundongos, somente um trabalho cita a indução de carcinogênese através da associação MNU+T, porém com um longo tempo experimental, de pelo menos 7 meses, para o desenvolvimento de lesões (TAYLOR et al., 2010).

Diante dessas informações, como podemos observar, apesar de tantas possibilidades ainda não é possível apontar o modelo que represente perfeitamente o desenvolvimento, progressão e metástase do CaP humano. Entre algumas das principais características que o modelo ideal desse tipo de câncer deveria apresentar está a progressão de lesões pré-malignas como a neoplasia intraepitelial prostática (NIP) para lesões malignas como o carcinoma *in situ* e o adenocarcinoma invasivo, com possíveis metástases (PIENTA et al., 2008). No que tange a essa característica, a literatura tem mostrado que o modelo de MNU+T atinge as expectativas.

É importante destacar ainda, a escassez de estudos que mostrem o emprego desse tipo de indução química de tumores de próstata em camundongos. Sabendo que para os estudos de vias moleculares específicas, o *knockout* de genes é de muita utilidade e, normalmente, linhagens isogênicas de camundongos são empregados como modelos *knockouts*. Assim, a viabilização desse modelo de indução por MNU+T em camundongos, em prazos menores de experimentação são de grande importância no contexto científico.

## **O TNF- $\alpha$ e sua relação com o câncer**

O emprego do nome “fator de necrose tumoral” foi feito primeiramente em 1962, quando observou-se que essa molécula era capaz de levar tumores transplantados em camundongos à rápida necrose hemorrágica (O’MALLEY; ACHINSTEIN; SHEAR, 1962). Treze anos mais tarde, essa atividade foi associada a uma proteína liberada por macrófagos, designada então como TNF (CARSWELL et al., 1975). Não se sabe ao certo se esse TNF seria a mesma proteína purificada e designada TNF- $\alpha$  10 anos mais tarde (ARGAWALL et al., 1985). Mesmo assim, atualmente os cientistas utilizam tanto o termo TNF quanto TNF- $\alpha$  para se referir ao mesmo elemento (WALCZAK, 2011).

O TNF- $\alpha$  é sintetizado e liberado principalmente por macrófagos ativados, linfócitos T e células NK (do inglês, *natural killers*) durante processos inflamatórios (porém sua expressão

também já foi identificada em fibroblastos, células musculares lisas e até em células tumorais) (MOCELLIN et al., 2005). Sua atividade desencadeia múltiplas respostas, as quais incluem diversos sinais para diferenciação, proliferação e morte celular (LEBREC et al., 2015). Diante disso, nota-se a influência do TNF no organismo humano no que diz respeito aos processos inflamatórios, podendo ele exercer atividades tanto positivas quanto prejudiciais à homeostasia corporal.

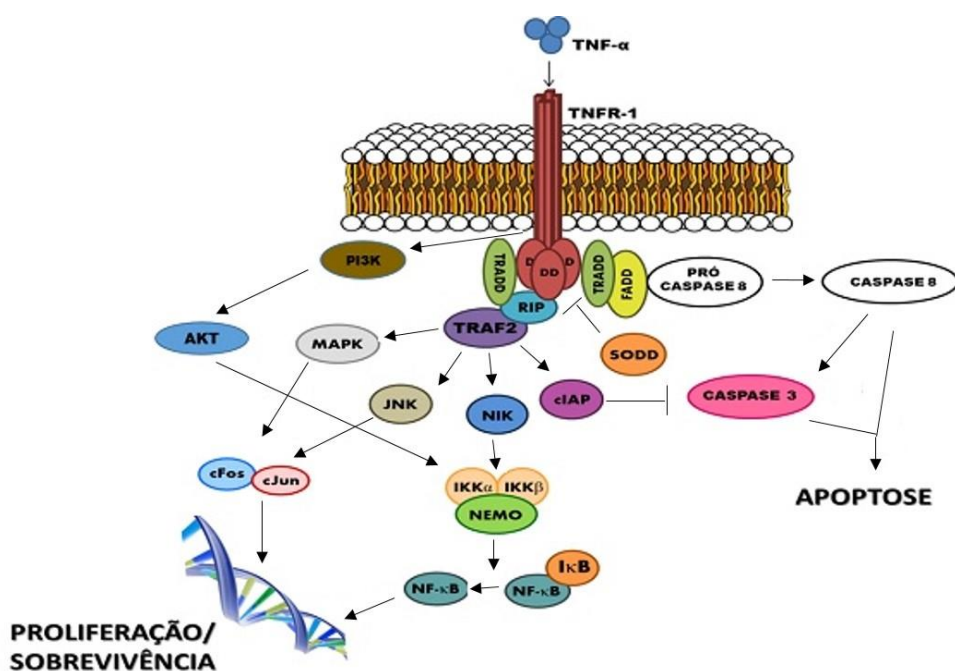
A estrutura do TNF- $\alpha$  corresponde à de uma proteína transmembrana homotrimérica e a sua clivagem pela enzima conversora de TNF- $\alpha$  gera sua forma solúvel (WALCZAK, 2011). O TNF sinaliza através de sua ligação aos receptores TNFR-1 e TNFR-2. O primeiro é expresso na grande maioria das células, enquanto o último é expresso principalmente pelas células do sistema imune (BALKWILL, 2009). Ainda, o TNFR-1 é o responsável pela maioria das respostas mediadas pelo TNF. Ele pertence à família dos receptores de morte, sendo assim, caracteristicamente possui um domínio de morte (DD, do inglês *death domain*) (TAKADA et al., 2003). Portanto, o TNFR-1 é o único dos dois tipos de receptores que está envolvido na via da morte celular (ASHKENAZI et al., 1998). Além disso, sua ativação desencadeia a via de dois principais fatores de transcrição, a do NF- $\kappa$ B e a do c-Jun, envolvidos na proliferação e crescimento celular (CHEN; GOEDDEL, 2002). Sendo assim, devido a esse seu papel paradoxal, tanto de morte como de sobrevivência, o TNFR-1 é alvo de muitas pesquisas.

A figura 2 ilustra a via de sinalização de TNFR-1/TNF. De maneira geral e resumida, a ativação desse receptor promove a atração de duas proteínas pertencentes à subclasse dos receptores de morte: o domínio de morte associado ao TNFR (TRADD) e o domínio de morte associado ao Fas (FADD) (WAJANT, 2003). Então, as enzimas responsáveis pelo início do processo de sinalização são atraídas para o sítio do receptor ativado. Na via apoptótica, a FADD recruta a caspase 8, que se ativa por autoclivagem, dando início à cascata de apoptose (HORSSSEN et al., 2006). Por outro lado, na via de sinalização para sobrevivência, a TRAF2 atrai as proteínas inibidoras da apoptose 1 e 2 (cIAP-1 e cIAP-2), as quais bloqueiam a ativação da caspase 8 (CHEN; GOEDDEL, 2002). Ainda, a ligação do TRAF2 inicia uma cascata de fosforilação, resultando na ativação de fatores de transcrição cFos/cJun, por meio da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e da proteína quinase N-terminal c-Jun (JNK) (HORSSSEN et al., 2006; SABIO; DAVES, 2014). Além disso, NF- $\kappa$ B pode ser ativado por TRAF2 e RIP; ou ainda através da fosforilação de IKK $\alpha$  pela AKT, a qual tem sua via diretamente ativada pelo receptor TNFR-1 (OZES et al., 1999; DEVIN et al., 2000). Enfim, as quatro proteínas ativadas, AKT, NF- $\kappa$ B, cFos e cJun, induzem a transcrição de genes



antiapoptóticos, proliferativos, imunomodulatórios e inflamatórios (Figura 2) (HORSSSEN; HAGEN; EGGERMONT 2006; SABIO; DAVES, 2014).

De acordo com Gaur e Aggarwall (2003), ambas as vias descritas são ativadas simultaneamente na mesma célula e a resposta resultante é consequência de um balanço vetorial entre os sinais apoptóticos e antiapoptóticos extracelulares. Diante disso, pode-se observar que o TNF pode desencadear dois tipos de respostas opostas: proliferação e sobrevivência ou morte celular de forma diversa nos diferentes tipos celulares (WALCZAK, 2011).



**Figura 2** - Esquema simplificado da sinalização do TNF-α para apoptose, proliferação e sobrevivência, via TNFR-1. PI3K – fosfatidilinositol 3 quinase; DD – domínio de morte celular; TRADD – domínio de morte associado ao TNFR; FADD – domínio de morte associado ao Fas; SODD – proteína silenciadora dos domínios de morte; RIP – proteína de interação com o receptor; TRAF2 – fator associado ao TNFR 2; MAPK – quinase ativada por mitógenos; JNK – quinase N-terminal cJun; NIK – quinase indutora de NF-κB; cIAP – proteína inibidora da apoptose; IKK – complexo quinase IκB; IκB – proteína inibidora de Kb; NEMO – modulador essencial de NF-κB.

Nesse contexto, a literatura mostra papéis anti e pró-tumorais do TNF. A atividade de fator de necrose, como já mencionado, foi a primeira associada a essa citocina, sendo a responsável pela sua denominação. Assim, o TNF- α passou a ser empregado no tratamento de alguns tipos de tumores (WANG; MAYO; BALDWIN, 1996; HORSSSEN; HAGEN; EGGERMONT, 2006). Um exemplo é a droga TNFerade<sup>TM</sup>. Trata-se de um vetor adenoviral expressando o TNF-α, que permite a ação da citocina em alta dosagem especificamente nas células tumorais com o objetivo de destruí-las, através da indução da apoptose (MUNDIT et

al., 2004). Além disso, já foi demonstrado que a expressão de TNFR-1 e sua ativação através do TNF- $\alpha$  em células de fibrosarcoma é favorável à rejeição tumoral, principalmente durante a quimioterapia (DENG et al., 2013). Por outro lado, muitas outras investigações revelaram uma atividade pró-carcinogênica do TNF. Dessa forma, já foi observado que, em determinadas células tumorais, essa citocina pode promover o aumento de reguladores positivos do ciclo celular e de vias de sinalização desencadeadas por fatores de crescimento (WU et al., 1993; GAIOTTI et al., 2000). Sendo assim, algumas drogas inibidoras de TNF (“TNFis”) são empregadas no tratamento de tumores sólidos, no sentido de conter seu crescimento (LEBREC et al., 2015).

No que tange ao CaP especificamente, essa citocina mostrou estar envolvida na supressão da expressão de ARs, devendo contribuir com a perda de responsividade das células aos andrógenos acompanhada da resistência à apoptose (MIZOKAMI et al., 2000). Outros estudos mostram que a atividade pró-carcinogênica do TNF no CaP deve estar envolvida com sua habilidade em induzir COX-2 e outros fatores angiogênicos, além de metaloproteases de matriz e quimiocinas (LUCIA; TORKKO, 2004). Em contrapartida, Chopra e colaboradores (2004) observaram diferentes padrões de susceptibilidade à apoptose induzida pelo TNF- $\alpha$  em culturas de células epiteliais normais e tumorais. Portanto, diante de todas as informações abordadas, torna-se claro o papel ambíguo que o TNF- $\alpha$  assume não apenas no CaP, mas também em outros tipos de câncer.

## **2 JUSTIFICATIVA**

O câncer de próstata é o segundo mais incidente no Brasil, e o mais frequente nos países industrializados. Diante disso, fica clara a grande importância de pesquisas que busquem tanto compreender a carcinogênese e o desenvolvimento do CaP, assim como elucidar os fatores etiológicos envolvidos nesses processos, a fim de chegar a alternativas para prevenção e tratamentos mais eficazes. Assim, é necessário o uso de modelos que permitam a mimetização do que seria o microambiente tumoral do organismo humano. Isso porque, o estudo da carcinogênese prostática em seres humanos é inviável, devido ao seu longo período de latência e a dificuldade de obtenção de material no que diz respeito à ética.

O TNF- $\alpha$  é uma importante citocina presente na inflamação crônica e que pode determinar, além da inflamação, duas respostas opostas: proliferação ou morte celular. Com isso, os estudos feitos no sentido de entender qual o papel dela nas neoplasias ainda são muito controversos e inconclusivos. Assim, como um efeito benéfico ou maléfico do TNF- $\alpha$  ainda não é bem

estabelecido para o câncer de próstata, estudos que viabilizem esse tipo de observação são necessários, sendo relevante o aprofundamento da análise de vias de apoptose, proliferação e sobrevivência celular durante a carcinogênese da próstata frente à estimulação por essa citocina.

Nesse sentido, um modelo de *knockout* de TNFR-1 é interessante para esclarecer de forma mais específica o real efeito dessa citocina no câncer de próstata. Até o presente momento, esta é a primeira investigação a estudar as vias moleculares da carcinogênese em camundongos com TNFR-1<sup>-/-</sup> em comparação com selvagens. Os resultados desse tipo de análise certamente abrirão caminho para a melhor compreensão dos efeitos do TNF- $\alpha$  na carcinogênese, dos mecanismos envolvidos na sua via de sinalização e outras vias *downstream*, bem como da real função das mesmas na carcinogênese prostática. Isso tudo pode fornecer uma base para estudos mais aprofundados na tentativa de descobrir alternativas de tratamento mais específicas e eficazes para essa doença.

### 3 OBJETIVOS

#### **Objetivo geral:**

Avaliar o papel da via de sinalização TNF- $\alpha$  na carcinogênese induzida quimicamente na próstata de camundongos C56Bl/6 *knockout* para o receptor tipo I dessa citocina.

#### **Objetivos específicos:**

- Avaliação do efeito do TNFR-1 na incidência e multiplicidade de lesões benignas, pré-malignas e malignas na próstata;
- Análise das vias de proliferação e sobrevivência celular, assim como apoptose na tentativa de desvendar o efeito paradoxal do TNF- $\alpha$ /TNFR-1;
- Entender a ação promotora ou inibidora do TNF- $\alpha$ /TNFR-1 na carcinogênese e na progressão maligna do câncer de próstata.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos C57Bl/6 machos (n = 50) adultos, com 60 dias de idade, sendo 26 deles *knockout* para TNFR-1 e 24 da linhagem selvagem. Os animais foram mantidos a 21°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração no Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU; processo nº 009/14).

### Indução química da carcinogênese

A indução da carcinogênese foi feita através da administração de N-metil-N-nitrosouréia (MNU) seguida de estímulo androgênico por testosterona. Para tanto, animais selvagem (WT; n = 16) e *knockout* (KO; n = 20) receberam dose única intra-peritoneal do carcinógeno MNU (Sigma; 40 mg/Kg de peso do animal). A droga foi pré-diluída em solução salina 0,9%, sendo administrada imediatamente após o seu preparo. Após essa indução, os animais foram tratados semanalmente com injeção subcutânea de propionato de testosterona (Deposteron, Sigma pharma) diluída em óleo mineral (veículo - 2mg/Kg de peso animal) durante o período de 6 meses (esse grupo foi designado durante o trabalho como MNU+T). Ainda, uma parte dos animais C57Bl6 selvagens (WT, n = 8) e *knockouts* (KO, n = 6) foi considerada como grupo controle e não passaram pelo processo de indução experimental, recebendo apenas administração do veículo. Após o sacrifício e pesagem dos animais, foram retirados os complexos prostáticos, que também foram pesados, e 35 deles foram processados para as análises morfológicas, enquanto 15 foram congelados para os ensaios bioquímicos.

### Processamento das amostras

O material destinado às investigações morfológicas e imunohistoquímica foi fixado por imersão em Metacarn (Metanol, Ácido Acético e Clorofórmio, na proporção de 6:3:1). Após fixação por 3 horas a 4°C, as amostras foram desidratadas em etanol, clarificadas em xilol e, então, incluídas em parafina. Para os ensaios bioquímicos, todo o complexo prostático dos grupos experimentais foi homogeneizado em tampão Cell Lysis contendo inibidores de

proteases (Coquetel - Sigma). As próstatas homogeneizadas foram deixadas reagindo por 30 min a 4°C. Então, as amostras foram centrifugadas a 18000xg por 20 min a 4°C e os sobrenadantes foram coletados e congelados para os ensaios posteriores de *blotting*, dosagem de TNF e mensuração da atividade das caspases 3 e 7.

### **Análise morfológica**

Do material incluído em parafina, obtido conforme a seção anterior, foram feitos cortes de 4 µm em micrótomo rotativo automático (Leica). Os cortes histológicos foram feitos em todo o complexo prostático de maneira seriada, pegando-se um corte e descartando os 6 seguintes, até que todo o material tivesse sido esgotado. Um a cada 10 cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para análise histopatológica. Se necessário, lâminas intermediárias foram também coradas para esse estudo. A partir das lâminas de cortes seriados das próstatas corados por HE, estudou-se a ocorrência de lesões benignas e malignas, as quais foram classificadas de acordo com Shappel e colaboradores (2004). Para isso, todas as lâminas coradas em HE foram digitalizadas em aumento de 200X usando câmera BX61VS (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) acoplada no sistema de scanner Olympus VS120® Virtual Microscopy Slide Scanning System (VS120-S5). Para a determinação de incidência, foram analisados 13 animais WT e 15 KO, ao passo que, para o estudo da frequência, 37 áreas histológicas foram estudadas em WT e 35 em KO. Tal investigação foi feita em triplo cego, de forma que nenhum dos pesquisadores envolvidos conheciam a identificação das lâminas.

Para o estudo das fibras colágenas no estroma da próstata, as lâminas foram coradas com picrosírius-hematoxilina. Tais lâminas foram então analisadas e fotomicrografadas em fotomicroscópio Zeiss-Jenaval, acoplado em sistema de aquisição de imagens, em aumento de 40X. Por conseguinte, foi determinada a frequência relativa de colágeno na próstata dorsolateral, como o colágeno. Essa análise esterológica foi efetuada com base em cortes histológicos em parafina submetidos à coloração por picrosírius-hematoxilina. Para tanto, foram digitalizados 10 campos microscópicos aleatórios do lobo dorsolateral de cada corte. A porcentagem de colágeno em cada campo foi determinada pela quantificação da intensidade de cor com o uso da ferramenta de limite de threshold do programa Image J (version 1.34; Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

## **Análises imunohistoquímicas**

Foram aplicados ensaios imunocitoquímicos nas próstatas dos camundongos para detectar a presença e distribuição de células proliferativas (PCNA), além da frequência relativa da distribuição de elementos da matriz extracelular, como a fibronectina. Marcações como p63 (marcador de célula basal), alfa-actina (marcador de integridade da camada fibromuscular), racemase (marcador de NIP e adenocarcinoma) e vimentina (marcador de fibroblastos) foram usados como critério diagnóstico das lesões. Para tanto, os cortes foram imersos em tampão citrato pH 6,0 e aquecidos a 98°C por 15 minutos para a recuperação antigênica. O bloqueio da atividade de peroxidase endógena foi efetuado tratando-se os cortes com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em metanol por 20 minutos. A seguir, o bloqueio de interações proteicas inespecíficas foi realizado através de albumina bovina 5% em PBS e da solução Backgorund Sniper (kit Biocare, USA). Depois, os cortes foram incubados com os anticorpos primários nas concentrações de 1:100 (PCNA, p63, alfa-actina e vimentina), 1:50 (racemase) e 1:400 (fibronectina) em BSA 1% em água destilada. As incubações ocorreram durante 1 hora a 37°C (PCNA – kit Biocare, USA) ou *overnight* a 4°C (p63, alfa-actina, vimentina e fibronectina – Santa Cruz, USA) ou 3 horas a 37°C (racemase – Santa Cruz, USA). Então, após serem lavados em PBS, os cortes passaram pela incubação com sistema de detecção polímero (Biocare, USA) por 1 hora em temperatura ambiente, com exceção dos cortes onde foi feita a marcação para racemase, os quais foram incubados com secundário anti-goat (Santa Cruz, USA) na concentração de 1:250 em BSA a 1% em água destilada. A revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB, DAB Chromogen Kit Biocare, USA), com tempo padronizado para cada anticorpo estudado, enquanto a contra coloração foi feita com hematoxilina de Harris.

## ***Western Blotting***

Os conteúdos de receptor androgênico AR, da proteína da via de proliferação e sobrevivência celular, mTOR em sua forma fosforilada, da metaloproteinase MMP2, e de beta-actina (controle endógeno) foram demonstrados por *western blotting*. Para isso, as amostras do homogeneizado do complaxo prostático foram analisadas pelo método de Bradford para quantificação do conteúdo de proteínas (processo de extração de proteínas descrito anteriormente). Posteriormente, 70 µg de proteína foram tratadas com solução para corrida de gel (Laemli sample buffer – na proporção de 1:1), contendo β-mercaptoetanol 5%, a aproximadamente 93°C por 5 minutos. Em seguida, as proteínas foram separadas em SDS-

PAGE e, após a corrida de eletroforese, transferidas para membrana de nitrocelulose. A ligação inespecífica de proteínas foi bloqueada através da incubação das membranas em leite desnatado 5% em água destilada ou em BSA 5% também em água destilada. O bloqueio foi feito durante 1 hora em temperatura ambiente. As membranas foram subsequentemente incubadas *overnight* com os anticorpos primários diluídos em BSA 1% em água destilada. As concentrações de anticorpo primário foram: 1:400 (AR – Santa Cruz, USA), 1:500 (mTOR e  $\beta$ -actina – Santa Cruz, USA) e 1:1000 (MMP2 – ABCAM, USA). Após lavagem em TBST, as membranas foram incubadas em anticorpo secundário específico conjugado à peroxidase, o qual foi diluído a 1:10000 (AR, mTOR e MMP2) e a 1:12000 ( $\beta$ -actina) em BSA 2% em água destilada por 1 hora (temperatura ambiente). Os componentes imunorreativos foram revelados pelo kit de detecção quimioluminescente BioRad (BioRad Company, USA) e a reação luminosa das bandas foi exposta em filmes autoradiograficos. Foram utilizadas amostras de 3 animais WT e KO de cada grupo experimental, e para obtenção dos resultados, foram comparadas as intensidades de marcação das bandas entre os grupos.

### **Dosagem de TNF- $\alpha$**

Os níveis de TNF- $\alpha$  foram quantificados por ELISA captura/sanduíche (anticorpo-antígeno-anticorpo), de acordo com especificações do fabricante. Para isso, alíquotas dos extratos do complexo prostático (método descrito anteriormente) foram centrifugadas a 400 xg por 10 min. A concentração da citocina foi quantificada utilizando kit de imuno ensaio (R&D Systems, Minneapolis, USA) e os seus níveis foram estimados de acordo com as especificações do fabricante. Todos os experimentos foram feitos em duplicata e estão expressos como media  $\pm$  desvio padrão. Foram utilizados 3 animais WT e 4 animais KO do grupo tratado com MNU e testosterona, e 4 WT e 3 KO do grupo controle.

### **Estudo da atividade das caspases 3 e 7**

A atividade proteolítica das caspases 3 e 7 foi mensurada por ensaio de fluorescência, através do kit Apo-ONE® Homogenous Caspase 3/7 Assay, de acordo com as especificações do fabricante (Promega, USA). O princípio da técnica reside na propriedade que as caspases 3 e 7 exibem em clivar o sítio c-terminal do resíduo de aspartato da sequência DEVD (Asp-Glu-Asp). Dessa forma, o kit fornece o substrato para a atividade das caspases 3 e 7 ligado à fluoresceína rodamina 110 (Z-DEVD-R110) que, em contato com as amostras contendo as



enzimas, exibe fluorescência, a qual é lida em leitora de microplacas no comprimento de ondas de 595 nm. O experimento foi realizado em duplicata, sendo utilizados 3 animais WT e KO de cada grupo experimental.

### **Análise estatística**

Todos os dados numéricos dessa investigação foram avaliados estatisticamente por teste ANOVA seguido de testes de múltiplas comparações entre grupos. Tais testes foram escolhidos de acordo com a distribuição amostral de cada parâmetro e estão especificados nas tabelas e figuras. Os dados não paramétricos foram analisados por Mann Whitney. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa Statistica 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

## **5 RESULTADOS**

### **Dados biométricos dos animais dos grupos experimentais**

As análises estatísticas mostraram que os animais da linhagem *knockout* do grupo controle apresentaram peso corporal significativamente menor em relação aos selvagens do mesmo grupo. Já, dentro do conjunto dos animais que passaram pela indução da carcinogênese (MNU+T), não houve diferenças significativas (Tabela 1). Com relação ao peso da próstata, os animais tanto selvagens quanto *knockout* que passaram pelo processo de carcinogênese apresentaram valores aproximadamente 40% maior do que aqueles do grupo controle (Tabela 1). Assim, observamos que a diferença de peso corporal é uma característica da linhagem dos camundongos, ao passo que o aumento do volume prostático pode ser inerente ao tratamento carcinogênico.

**Tabela 1** – Dados biométricos dos camundongos selvagens e knockouts dos grupos controle e tratados com MNU e testosterona

<b>Linhagem</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Peso corporal (g)</b>	<b>Peso do complexo prostático(g)</b>
WT	veículo	34,1 ± 0,7437	0,12 ± 0,010
KO	veículo	28,2 ± 1,636*	0,12 ± 0,009
WT	MNU + T	33,5 ± 0,4749	0,16 ± 0,004*
KO	MNU + T	30,1 ± 0,8051	0,17 ± 0,006*

Os dados representam média ± erro padrão da média. Teste ANOVA seguido de teste de Tukey-Kramer (\*p<0,05, diferença significativa em relação aos respectivos controles).

### **Incidência e multiplicidade das lesões prostáticas**

As amostras do complexo prostático foram coletadas e processadas para estudos morfológicos e bioquímicos. Primeiramente, seguimos com as análises histopatológicas do material, a fim de investigar a possível formação de tumores nos grupos experimentais.

A análise dos grupos controles mostrou que não há incidência de lesões malignas nos grupos selvagens e *knockout*. Por esse motivo, a tabela 2 trata dos resultados obtidos da análise histopatológica dos camundongos que passaram pelo processo de indução da carcinogênese. Nossa examinação mostrou que, dentre os animais tratados com MNU e testosterona, ambas as linhagens selvagem e *knockout* desenvolveram alterações benignas, pré-malignas e malignas. É importante ressaltar que essas lesões ocorreram predominantemente na região do lobo dorsolateral da próstata desses animais. Sendo assim, tal resultado demonstra que obtivemos sucesso com esse modelo de indução e que as lesões ocorrem no lobo de maior similaridade com os adenocarcinomas humanos.

Dentre as lesões benignas, observamos a ocorrência de hiperplasia e fibroadenoma, enquanto as lesões pré-malignas corresponderam à NIP, e as malignas, ao adenocarcinoma (classificação segundo Shappel et al, 2004). Apesar de ter acometido tanto animais selvagens quanto *knockout*, a incidência de adenocarcinoma foi significativamente maior nos primeiros (Tabela 2). Além disso, pudemos observar que a frequência com que esse tipo de lesão ocorreu nas áreas histológicas analisadas acompanhou os dados de incidência, se mostrando também maior nos animais dessa linhagem (Tabela 2). Sendo assim, nossos dados mostram que o tratamento com o carcinógeno MNU associado à administração crônica de T foi capaz de

promover o desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas tanto nos animais que expressam TNFR-1 quanto nos que não expressam. Porém, a ausência desse receptor e sua sinalização reduziu a incidência e frequência de adenocarcinoma na próstata de camundongos, mostrando uma possível relação dessa via com a progressão maligna na próstata.

**Tabela 2** - Incidência e frequência das alterações morfológicas observadas nas próstatas dorsolaterais de animais selvagem e *knockout* tratados com MNU+T

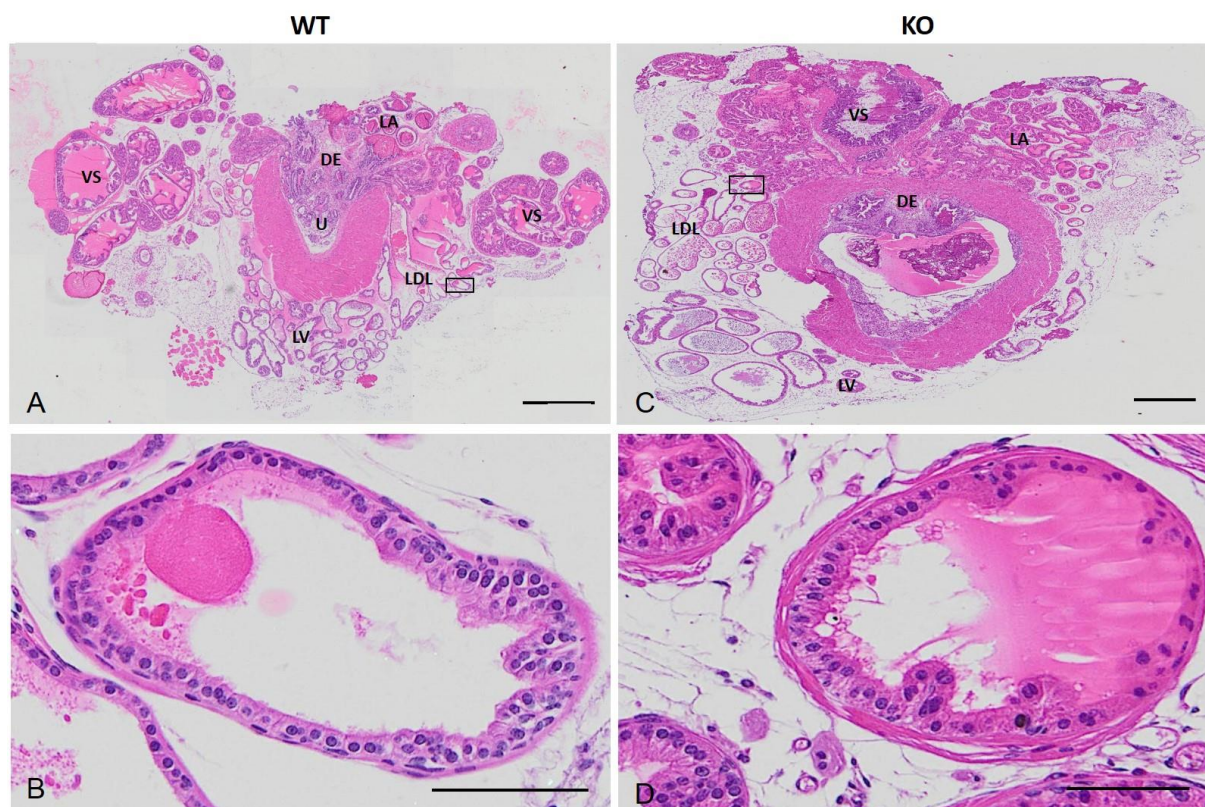
Alterações morfológicas	Incidência		Frequência	
	WT	KO	WT	KO
Hiperplasia	61%	53%	30%	23%
Fibroadenoma	23%	20%	8%	8%
NIP	69%	87%	16%	57%*
Adenocarcinoma	61%	20%*	32%	14%

WT – n = 13 animais para o estudo de incidência e 37 áreas histológicas para o estudo de frequência; KO – n = 15 animais para o estudo de incidência e 35 áreas histológicas para o estudo de frequência.

\* p<0,05 ANOVA seguido de teste de Fisher.

### Estudo morfológico

O estudo morfológico foi realizado em WT e KO controles para avaliarmos se a ausência de TNFR-1 acarreta diferenças estruturais na próstata de camundongos. Conforme podemos observar na figura 3, não existem diferenças no padrão geral dos lobos anterior, ventral ou dorsolateral na próstata de KO em relação aos selvagens. Além disso, o epitélio secretor prostático exibe as mesmas características morfológicas, com células cúbicas ou colunares, arranjadas em um epitélio simples, exibindo atividade secretória aparentemente normal. Sendo assim, esse resultado mostra que o tratamento dos animais apenas com o veículo óleo mineral não influenciou nas características morfológicas das próstatas dos mesmos. Além disso, descartam-se possíveis diferenças na morfologia do órgão associadas à cada linhagem animal.



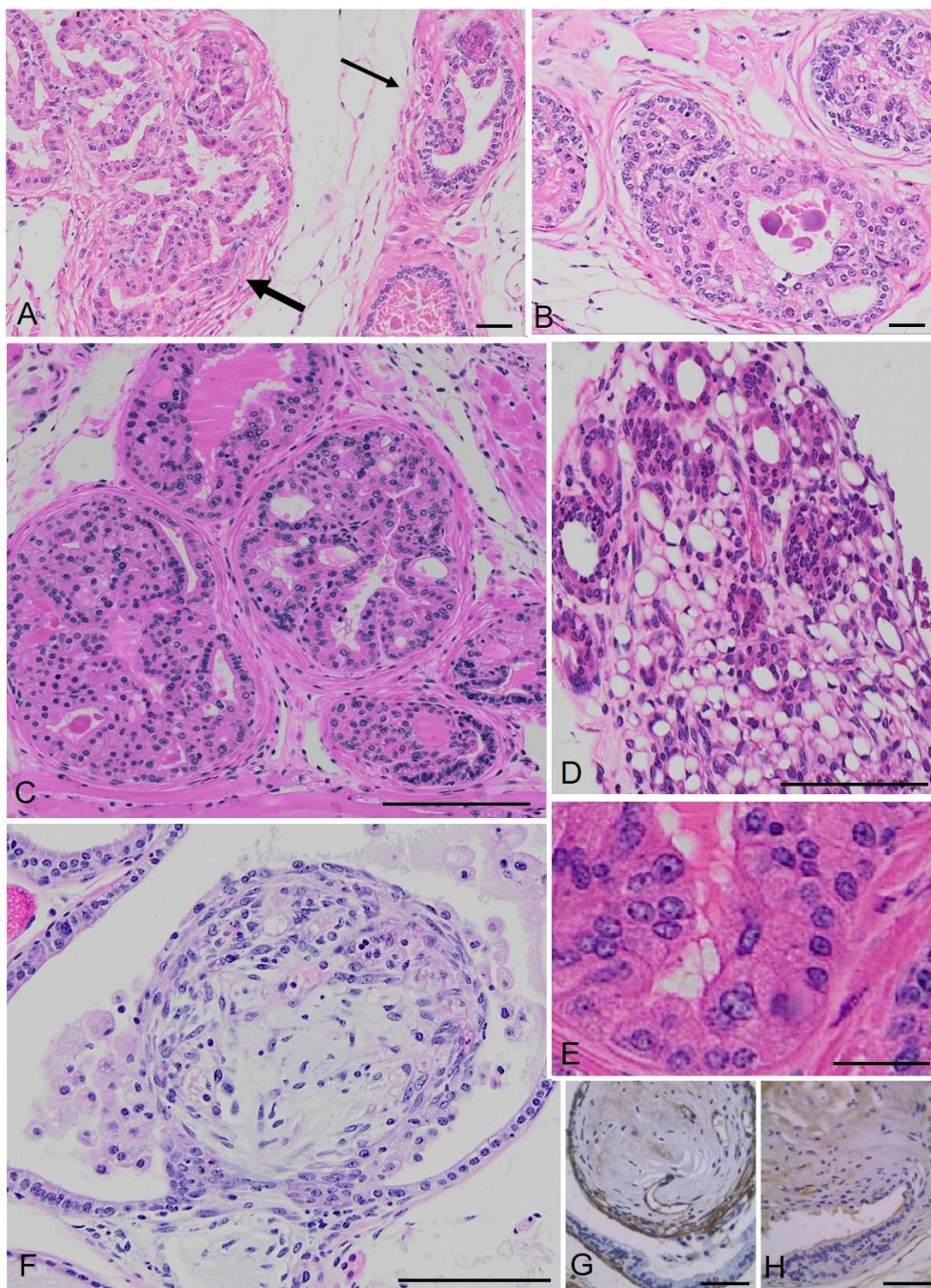
**Figura 3** – Fotomicrografias de todo o complexo prostático de camundongos selvagem (WT – A e B) e *knockout* (KO – C e D) que não passaram pela indução química da carcinogênese. Os quadros destacados em A e C estão ampliados em B e D mostrando em detalhe os ácinos do lobo dorsolateral. Podemos notar a ausência de diferenças morfológicas glandulares entre animais de ambas as linhagens. VS – vesícula seminal; DE – ductos ejacutórios; U – uretra; LA – lobo anterior; LDL – lobo dorso-lateral; LV – lobo ventral. Barras de escala: A – 10 µm; B - 350 µm; C – 500 µm; D – 275 µm.

No caso dos grupos que passaram pela indução com MNU+T, a análise morfológica serviu para a determinação da incidência e frequência das lesões desenvolvidas nos camundongos WT e KO. A figura 4 apresenta as características histológicas das lesões encontradas em nosso modelo experimental. A hiperplasia corresponde a um aumento do número de células dentro do epitélio, mas mantendo as características semelhantes às do tecido normal, sem alterações nucleares típicas (Figura 4A). Já, a neoplasia intraepitelial prostática -NIP- é caracterizada por estratificação epitelial causada pela proliferação descontrolada das células, que apresentaram núcleos atípicos, pleomórficos. (Figura 4B). Essa lesão, por não apresentar características invasivas típicas e, devido à sua alta atividade proliferativa, é considerada uma lesão pré-maligna com probabilidade de desenvolvimento maligno. Da mesma forma, as lesões malignas são caracterizadas também pela ocorrência de pleomorfismo nuclear, o qual, nesse caso, é bastante evidente, definido pela presença acentuada de núcleos de tamanhos irregulares, nucléolos evidentes e numerosos, e coloração hipercromática (em evidência na figura 4E). Tais lesões correspondem ao adenocarcinoma, o qual pode se apresentar na forma “*in situ*” ou

invasiva. No primeiro caso, a lesão se encontra ainda contida por uma camada de tecido fibromuscular (Figura 4C), e no segundo, essa camada se perde levando à invasão das células para o estroma e tecido adiposo adjacente, onde elas se organizam formando microácinos. Interessantemente, dentre os adenocarcinomas observados no grupo selvagem, notamos um caso de carcinoma com células de sinete (*Signet ring carcinoma*) (Figura 4D). Anel de Sinet é um termo utilizado para descrever a aparência histológica de um tumor com células caracterizadas pela presença de um grande vacúolo citoplasmático que comprime o núcleo na periferia celular. Tais células lembram adipócitos, porém tem marcação negativa para lâmina basal que está presente nas células adiposas. Esse tipo de carcinoma é muito raro, porém bastante agressivo.

Nossos resultados mostraram ainda a formação de fibroadenoma, uma lesão benigna, identificada pela perda de integridade do epitélio e consequente invasão do tecido estromal para o lúmen acinar (figura 4F,G e H). Análises imunohistoquímicas para elementos estromais como alfa-actina de músculo liso e vimentina foram positivas nessa lesão (Figura 4G e H).



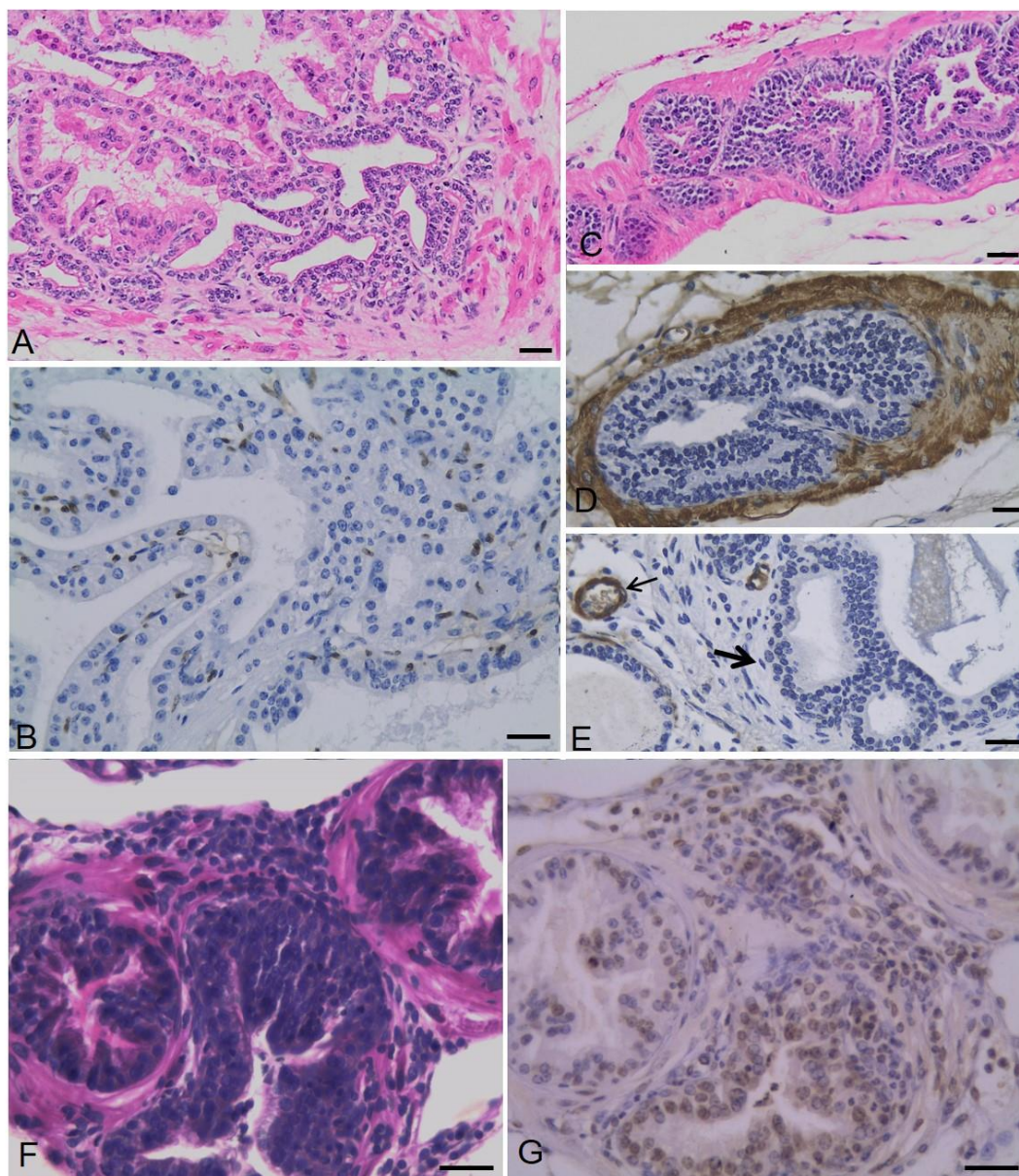


**Figura 4** – Cortes histológicos da próstata dorsolateral evidenciando as lesões benignas e malignas encontradas nos animais que passaram pelo processo de carcinogênese induzida quimicamente. As fotomicrografias representam as lesões benignas e malignas ocorridas na próstata dorsolateral coradas por hematoxilina e eosina (A-H) e por imunomarcação para alfa-actina e vimentina (G-H respectivamente). A – Região de NIP com padrão cribiforme (seta larga) e região de hiperplasia prostática benigna (seta fina); B – Adenocarcinoma *in situ* com formação de microácinos; C – Carcinoma ductal; D – Adenocarcinoma invasivo com padrão "signet ring"; E – Ampliação do epitélio em C, dando destaque para os núcleos irregulares e com cromatina hipercromática; F – Fibroadenoma; G – H – imunomarcação positiva para alfa actina para músculo liso e vimentina para fibroblastos, respectivamente, evidenciando a invasão das células estromais, como as musculares lisas e os fibroblastos, para o interior do ácino glandular. Barras de escala: A – 75  $\mu$ m; B – 75  $\mu$ m; C – 305  $\mu$ m; D – 305  $\mu$ m; E – 200  $\mu$ m; F – 315  $\mu$ m; G - 100  $\mu$ m; H – 100  $\mu$ m.

### **Imunohistoquímica para caracterização das lesões malignas**

As lesões malignas foram caracterizadas com o uso de imunohistoquímica para marcadores moleculares que avaliaram a integridade da camada basal epitelial (p63), integridade da camada fibromuscular (alfa-actina de músculo liso) e racemase. Nesse contexto, sabe-se que o epitélio da próstata de camundongos, ao contrário da de humanos, apresenta uma camada de células basais descontínua, entretanto, as mesmas encontram-se regularmente distribuídas acompanhando a camada de células luminais ao redor dos ácinos. No adenocarcinoma observamos a ausência ou total desorganização das células basais nos pontos da lesão (Figura 5A e B). Além disso, tais lesões apresentam descontinuidade ou ausência da camada fibromuscular ao redor dos ácinos. No caso do carcinoma *in situ* a camada fibromuscular, embora irregular, ainda está presente (Figura 5C e D), enquanto nas lesões invasivas, nota-se ausência total da camada fibromuscular (Figura 5E). Aliado à essas marcações, estudamos a distribuição de racemase, que é uma enzima presente em mitocôndrias e peroxissomos e que se tornou um importante marcador molecular de malignidade do tumor de próstata, uma vez que se encontra altamente expressa em adenocarcinoma desse órgão. Nossas análises mostraram a presença da mesma nas regiões de suspeita de adenocarcinoma que, associada às demais marcações, comprovam a malignidade das lesões encontradas (Figura 5F e G).





**Figura 5** – Fotomicrografias das lesões malignas e suas imunomarcações em cortes sequenciais da próstata dorsolateral de camundongos. A – Adenocarcinoma invasivo, coloração por HE; B – corte consecutivo de A com imunomarcação de p63 para células basais, evidenciando a total desorganização da camada basal, com pontos de ausência da mesma; C – Adenocarcinoma *in situ*, coloração por HE; D – corte consecutivo de C com imunomarcação para alfa-actina, mostrando a pontos de descoloração da camada fibromuscular circundando uma região de lesão; E – Corte consecutivo de B, mostrando a perda da camada fibromuscular (seta grossa). A seta fina mostra a marcação positiva da alfa-actina em vasos sanguíneos; F – Adenocarcinoma invasivo, coloração por HE; G – Corte consecutivo de F com marcação positiva para racemase. Barras de escala: A – 50  $\mu\text{m}$ ; B – 820  $\mu\text{m}$ ; C – 60  $\mu\text{m}$ ; D - 55  $\mu\text{m}$ ; E – 65  $\mu\text{m}$ ; F – 102  $\mu\text{m}$ ; G – 102  $\mu\text{m}$ .



### **Análise do perfil proliferativo**

Após a caracterização das lesões e análise de incidência, realizamos ensaios para avaliar o nível de proliferação celular na próstata dos camundongos selvagens e *knockouts* para TNFR-1, bem como as vias moleculares relacionadas com tal atividade. Nesse sentido, observamos que, no grupo controle tratado apenas com óleo mineral, os animais KO exibiram um número significativamente reduzido de células em proliferação do que os WT (Figura 6A e D; Figura 7A). Mesmo após a indução da carcinogênese, ainda nota-se 50% menos células PCNA-positivas em KO em relação aos camundongos da linhagem selvagem (Figura 6G e J; Figura 7A). Esse mesmo padrão de resultado também é encontrado na análise da frequência relativa de células em proliferação (Figura 7A).

Ainda, foram analisadas proteínas de duas importantes vias relacionadas com a proliferação e sobrevivência celular, tais como o receptor de andrógeno (AR) e mTOR em sua forma fosforilada. A figura 8 nos mostra que os animais KO controles exibem uma maior expressão de AR em relação aos selvagens, enquanto a ativação de mTOR é reduzida. Após a carcinogênese, observa-se uma acentuada redução na expressão de AR e manutenção dos reduzidos níveis de ativação de mTOR nesses camundongos *knockout*. Por outro lado, os camundongos WT também mostram redução dos níveis de AR, ao passo que mantém altos os níveis de mTOR-p após a carcinogênese (Figura 8).

Assim, esses resultados corroboram com nosso achado inicial e justificam a menor incidência de adenocarcinoma na próstata dorsolateral nos animais KO em relação aos WT. Isso nos mostra que a ativação da via do receptor TNFR-1 possivelmente esteja relacionada ao estímulo de vias de promoção da proliferação e sobrevivência celular.

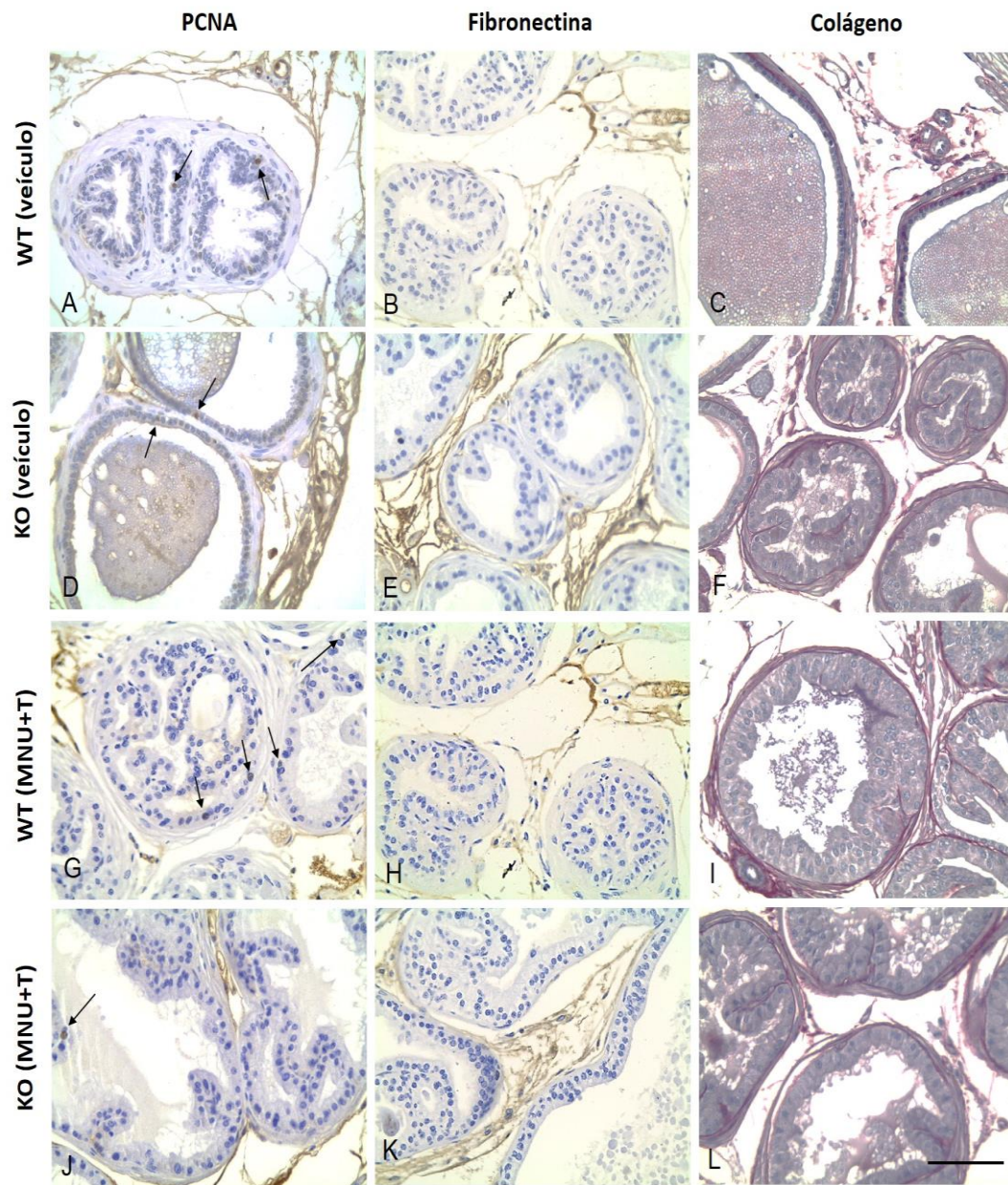
### **Avaliação do estroma e sua remodelação na próstata dorsolateral**

Outro objetivo do nosso trabalho foi analisar os possíveis elementos estromais envolvidos no desenvolvimento tumoral e que poderiam ser modulados pela ativação ou não do receptor para TNF- $\alpha$ , TNFR-1. Dado que a progressão tumoral envolve a remodelação da matriz extracelular, buscamos estudar a distribuição relativa (%) de colágeno e fibronectina, bem como o conteúdo de MMP-2, uma metaloproteína com função de degradação de componentes da matriz extracelular.

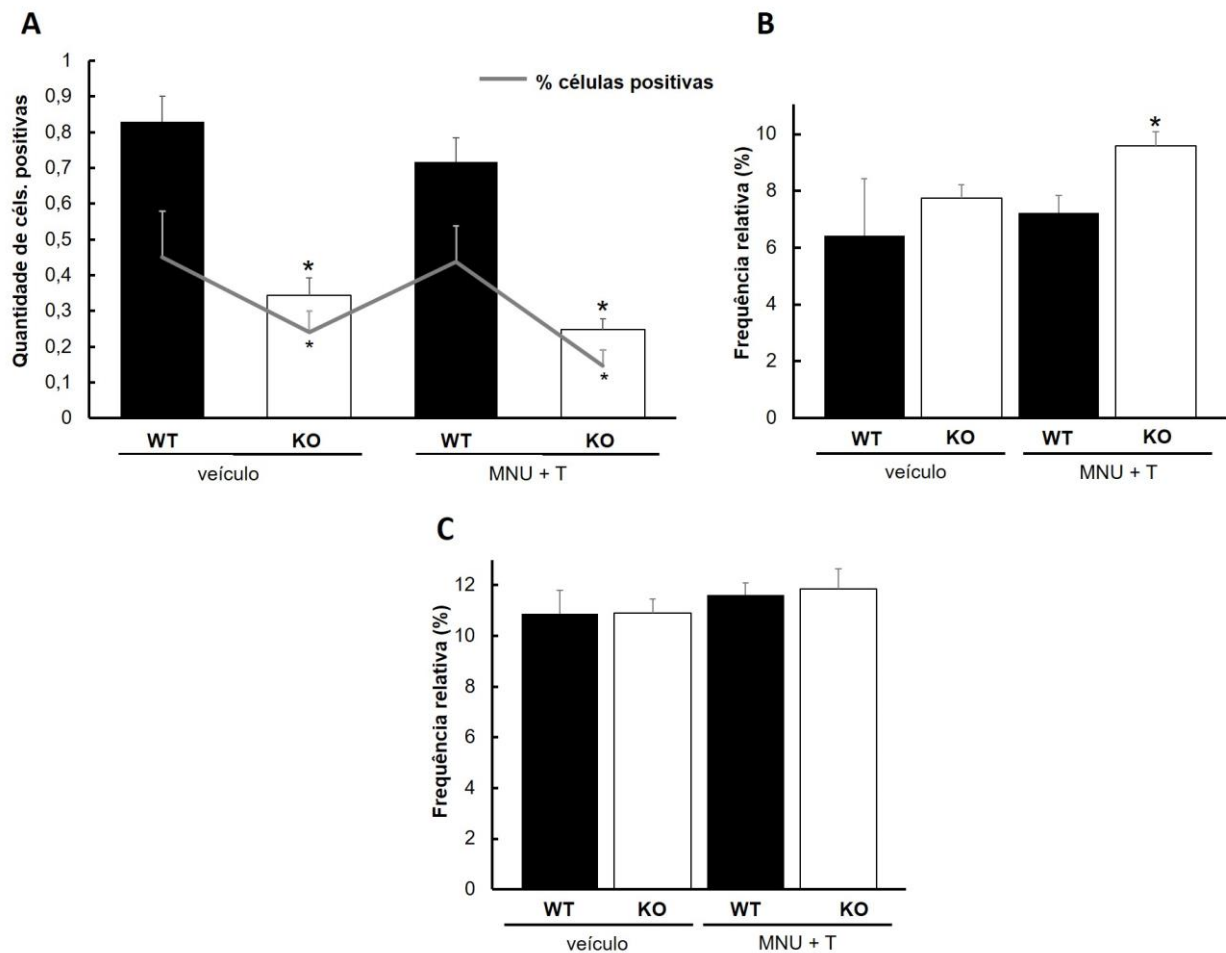
Nossos dados mostram que a distribuição de colágeno se manteve inalterada em todos os grupos experimentais (Figura 6C, F, I e L; Figura 7B). Por outro lado, observamos um aumento significativo da frequência relativa de fibronectina no estroma prostático dos animais KO

tratados com carcinógeno em comparação aos WT (Figura 6H e K; Figura 7C). Entre os grupos controle também se observa esse padrão de maior distribuição de fibronectina em KO, mas sem diferenças estatísticas (Figura 6B e E; Figura 7C). Quando analisamos a MMP2 por *western blotting*, notamos que os animais KO do grupo controle exibem uma maior expressão dessa enzima. Após a carcinogênese nota-se um aumento dessa enzima nos animais selvagens enquanto há redução da expressão de MMP2 em KO (Figura 8).

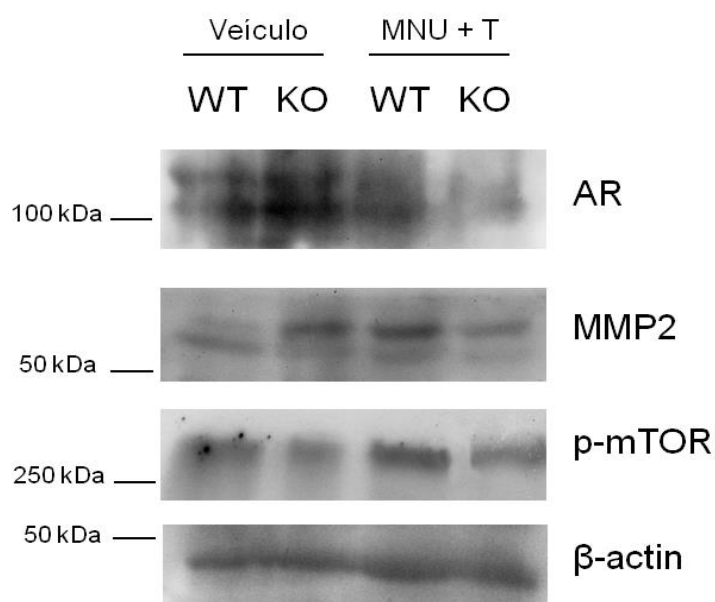
Juntos, esses dados estromais sugerem que no grupo KO que passou pela carcinogênese, possivelmente a menor quantidade de MMP2 previne grandes remodelações da matriz extracelular que poderiam estimular o desenvolvimento tumoral, justificando também a menor incidência tumoral nesse grupo.



**Figura 6** – Fotomicrografias da distribuição de colágeno bem como imunomarcação de fibronectina e PCNA na próstata dorsolateral de camundongos selvagem e *knockout* tratados ou não com carcinógeno. A; D; G; J – Imunomarcação para PCNA. B; E; H; K – Imunomarcação para fibronectina. C; F; I; L – Coloração para colágeno com picrosirius red. As setas indicam os núcleos das células proliferativas. Veículo – animais que receberam administração apenas de óleo mineral; MNU + T – animais que receberam administração do carcinógeno MNU seguido de testosterona. Barra de escala: 200  $\mu$ m.



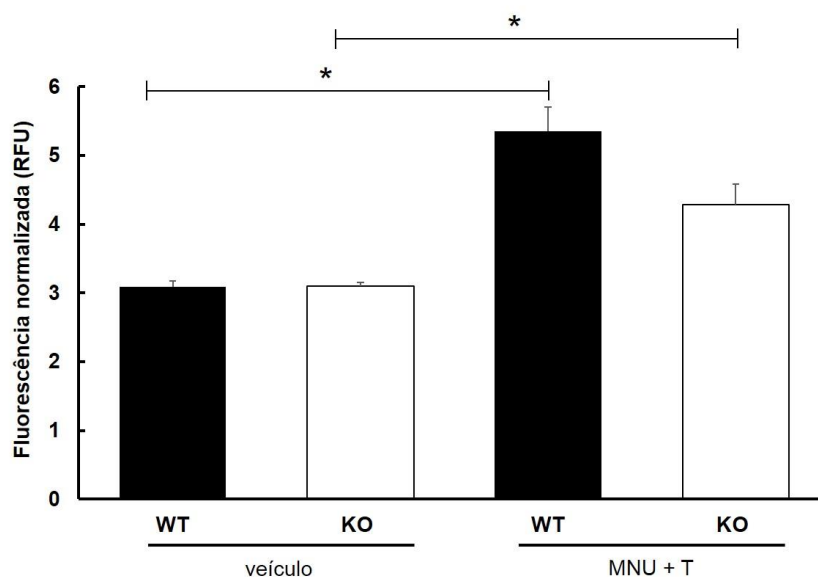
**Figura 7** – Gráficos das frequências relativas (%) da distribuição de colágeno (A) e fibronectina (B) e da quantidade e porcentagem de células proliferativas na próstata dorsolateral dos animais estudados (C). A - Observe que não há diferença significativa entre os grupos estudados; B – Após a carcinogênese há um aumento dessa glicoproteína em KO; C – A quantidade (barras) e a frequência relativa (linha) de células positivas para PCNA está reduzida em KO tanto controle quanto nos tratados. Veículo – animais tratados apenas com óleo mineral; MNU + T – animais tratados com o carcinógeno MNU e testosterona. Em A e B, teste ANOVA seguido do pós-teste Tukey-Kramer; em C, teste de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$



**Figura 8** – Western blotting para AR, MMP2 e p-mTOR na próstata de camunongos com (WT) e sem expressão de TNFR-1 (KO). Veículo – animais que receberam administração apenas de óleo mineral; MNU+T – animais que receberam administração do carcinógeno MNU e testosterona. β-actina: controle positivo.

### Estudo da atividade das caspases 3 e 7

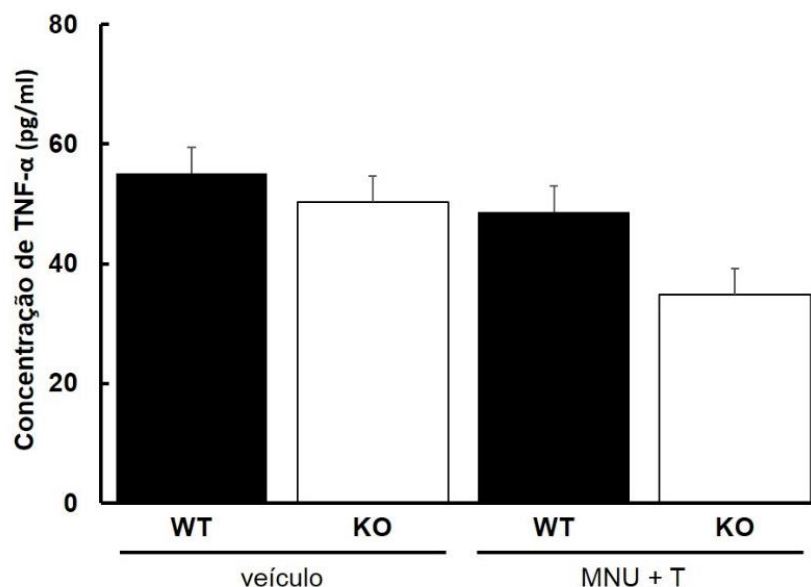
Investigamos ainda, uma possível atividade pró apoptótica do TNF- $\alpha$  através de seu receptor TNFR-1, tendo em vista a capacidade do mesmo de desencadear ambas as vias de proliferação e morte celular. Para tanto, foi realizado um ensaio que permitiu a mensuração da atividade das caspases 3 e 7 em nossas amostras. Essa análise nos mostrou que a apoptose não está alterada nos animais KO comparado aos WT em nenhuma situação experimental. Em contrapartida, ambas as linhagens de camundongos apresentou uma atividade significativamente maior das caspases 3 e 7 após a carcinogênese (Figura 9). Baseado nesses dados, sugerimos que, no caso da próstata, o TNFR-1 não tem efeito apoptótico uma vez que não há diferença entre os animais selvagens e *knockout*; e hipotetizamos que o aumento da apoptose nos grupos que passaram pela indução da carcinogênese seja uma resposta positiva à administração do agente químico MNU, no sentido de proteger o organismo contra sua ação danosa.



**Figura 9** – Ensaio de mensuração da atividade das caspases 3 e 7 na próstata de camundongos com (WT) e sem expressão de TNFR-1 (KO). Veículo – animais que receberam administração apenas de óleo mineral; MNU + T – animais que receberam administração do carcinógeno MNU e testosterona. Teste de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$ , diferença significativa em relação aos seus respectivos controles.

### Dosagem de TNF- $\alpha$

Aventamos a hipótese de que a citocina TNF- $\alpha$  poderia estar aumentada nos animais em que o receptor TNFR-1 (responsável pelas principais respostas dessa molécula) é ausente. Assim, realizamos a dosagem dessa citocina na próstata através do método de ELISA. Com isso, pudemos observar que não há diferença no conteúdo prostático dessa citocina em nenhum grupo experimental (Figura 10), descartando a hipótese de que a ausência do receptor TNFR-1 levaria a um aumento compensatório da produção de TNF- $\alpha$ .



**Figura 10** – Valores da dosagem de TNF- $\alpha$  nas amostras da próstata de animais selvagem (WT) e *knockouts* (KO) tratados ou não com carcinógeno. Veículo – animais que receberam administração apenas de óleo mineral; MNU + T – animais que receberam administração do carcinógeno MNU e testosterona. Teste de Mann-Whitney.

## 6 DISCUSSÃO

Vários estudos já descritos na literatura mostram sucesso do emprego do modelo experimental da indução de carcinogênese na próstata com o uso de MNU+T com desenvolvimento de lesões malignas na próstata de ratos e gerbilos (GONÇALVES et al., 2010; GONÇALVES et al., 2013; SHARMILA et al., 2014; PEIXOTO et al., 2015). Entretanto, apenas um trabalho foi feito em camundongos e num período de indução superior ao utilizado nesse trabalho (TAYLOR et al., 2010). Nossos resultados mostram o desenvolvimento de hiperplasia, fibroadenoma, NIP e adenocarcinoma em consequência da indução química com o modelo acima descrito. Esses achados ocorreram principalmente no lobo dorsolateral da próstata dos animais estudados, um dado muito importante, tendo em vista a homologia entre esse lobo e a zona periférica da próstata humana, região de maior ocorrência de CaP (McNEAL et al., 1988; SHAPPEL et al., 2004). Assim, mostramos através do presente trabalho, o sucesso da indução química da carcinogênese prostática em camundongos com uso de MNU+T, com a consequente formação de lesões benignas, pré-malignas e malignas, durante um período de tempo inferior ao já descrito na literatura para essa espécie animal.

Investigações sobre o envolvimento da via TNF- $\alpha$ /TNFR-1 na carcinogênese de diversos outros tumores, como o da pele, fígado, cólon e estômago mostram o aumento da incidência de lesões malignas naqueles animais em que essa via está ativa (MOORE et al.,

1999; KNIGHT et al., 2000; POPIVANOVA et al., 2008; OSHIMA et al., 2014). Reforçando esses achados, nosso estudo mostrou que a incidência de lesões foi maior nos animais que possuíam TNFR-1, indicando fortemente que esse receptor pode estar envolvido no desenvolvimento tumoral através da via de proliferação e sobrevivência celular. Em contrapartida, embora a incidência tenha sido significativamente menor, o desenvolvimento de adenocarcinoma também ocorreu nos animais *knockout*, indicando apenas uma proteção e não um total impedimento do TNFR-1 no desenvolvimento tumoral. Nesse contexto, Jin e colaboradores (2014) mostraram que animais em que o fator de transcrição NFκB estava constitutivamente expresso na próstata, apresentaram hiperproliferação epitelial após o período de 6 meses. Somado a isso, sabendo que: a ativação constitutiva de NFκB por si só é capaz de promover hiperplasia, podendo até gerar sua hiperativação, resultando em NIP e adenocarcinoma em humanos (NGUYEN, 2014); o agente químico MNU induz a formação de lesões devido ao seu potencial inflamatório, aumentando a expressão de proteínas pró inflamatórias, assim como de NFκB (VERMA; BAHORUN; KUMAR, 2012); e que tal superexpressão em um ambiente inflamatório, como o dos animais tratados com carcinógeno, culminam na ativação constitutiva de NFκB (LU; STARCK, 2004; BALKWILL, 2006), podemos justificar o desenvolvimento tumoral, ainda que menos incidente, nos nossos animais KO, assim como nos selvagens.

No que diz respeito à via de sinalização do TNF-α através de seu receptor TNFR-1, sabe-se que ela pode levar à ativação dos fatores de transcrição c-Jun e NFκB, culminando na sobrevivência e proliferação celular, ou ainda, pode ativar a via das caspases, que leva à apoptose (TSE; SCOTT; RUSSELL, 2012). Nesse contexto, Moore e colaboradores (1999) em um trabalho sobre carcinogênese de pele observaram uma queda de aproximadamente 50% na taxa de proliferação de queratinócitos em animais TNF-α<sup>-/-</sup> quando comparados com os selvagens. Da mesma forma, Knight e colegas (2000) também observaram uma redução de 23% das células proliferativas no fígado de animais TNFR-1<sup>-/-</sup>. Outros estudos mostram ainda que a diminuição da expressão de TNFR-1 em células de câncer de ovário também acarretam a queda de proliferação celular (PENG et al., 2015). Corroborando com a literatura, a nossa investigação revelou que os animais *knockout* exibiram uma menor taxa proliferativa tanto em relação aos selvagens controles quanto àqueles tratados com MNU+T e este dado justifica a menor incidência de adenocarcinoma nesse grupo. Assim, podemos sugerir que a sinalização TNF-α/TNFR-1 desencadeia mais as vias de resposta proliferativa na próstata do que apoptótica, estimulando o desenvolvimento tumoral.



Em sequência, com o objetivo de analisar o papel paradoxal da via TNF- $\alpha$ /TNFR-1, comprovar a via proliferativa em preponderância e o seu envolvimento na carcinogênese, estudamos também a apoptose na próstata de camundongos selvagens e TNFR-1<sup>-/-</sup>. Nossos achados mostraram que não há diferença na ativação de caspase 3/7 entre os animais selvagens e *knockouts*. Entretanto, há um aumento significativo dessa atividade nos grupos que passaram pela carcinogênese. De maneira semelhante, estudos sobre câncer de cólon em que o eixo TNF/TNFR-1 estava ausente mostram um aumento da apoptose de maneira análoga nos animais KO e WT (POPIVANOVA et al., 2008; STILLIE; SAPP; STADNYC, 2012). Portanto, podemos inferir que a atividade apoptótica aumentada observada em nossos achados é provavelmente uma resposta orgânica ao tratamento químico com o carcinógeno MNU. Além disso, uma vez que não há diferença no conteúdo de apoptose nos animais TNFR1<sup>-/-</sup>, demonstramos, portanto, que a via de morte celular não é predominante no eixo TNF- $\alpha$ /TNFR-1 na próstata de camundongos.

De acordo com a literatura, a indução da proliferação por TNF- $\alpha$  através de seu receptor TNFR-1 em muitos tipos de tumores ocorre principalmente por meio da ativação de NF $\kappa$ B que, por sua vez, também pode ser ativado por/ ou ativar a via de sobrevivência e proliferação PI3K/AKT/mTOR (POLIGONE et al., 2013; OSHIMA et al., 2014; ZHU et al., 2014). Embora os estudos sobre os efeitos dessa via na carcinogênese da próstata na ausência dos efeitos de TNFR-1 sejam inexistentes, estudos em outros tecidos podem ser usados de maneira comparativa. Nesse sentido, estudos mostram que a diminuição da expressão de TNF- $\alpha$  em células tumorais de vesícula biliar promove também a diminuição da quantidade de AKT fosforilada e NF $\kappa$ B, com consequente queda da atividade proliferativa dessas células (ZHU et al., 2014). HUSSAIN et al (2012) demonstrou o crosstalk entre NF $\kappa$ B e PI3K/AKT em linhagens de linfoma e demonstraram que a redução da primeira reduz também a última com consequente aumento de apoptose. Então, podemos dizer que a queda no conteúdo prostático de mTOR nos camundongos *knockout* da presente investigação é um dos fatores responsáveis pela diminuição da proliferação celular nesse grupo. Mais do que isso, nossos resultados conciliam também com dados recentes que mostram o aumento da expressão de mTOR ativada em amostras de pacientes com diversos graus de CaP, evidenciando também uma forte correlação entre a regulação positiva dessa proteína durante o início do desenvolvimento tumoral e a formação de lesões pré-malignas (SUTHERLAND et al., 2014). Assim, nossos dados mostram que a ativação de TNFR-1 regula positivamente a proliferação celular através da via AKT/mTOR na

próstata de camundongos e a ausência de TNFR-1 reduz essa importante via de sinalização, influenciando na proliferação celular e na carcinogênese.

Com relação aos receptores de andrógenos (ARs), sabe-se que os mesmos estão envolvidos com os estágios iniciais da carcinogênese prostática, em parte promovendo a proliferação e inibindo a apoptose (TSE; SCOTT; RUSSEL, 2012). Entretanto, nossos dados, de forma surpreendente, mostram uma redução de AR em ambos os grupos (WT e KO) após a carcinogênese, mesmo com tratamento androgênico crônico. Um estudo anterior sobre a carcinogênese na próstata de ratos tratados com MNU demonstram a perda da expressão de AR concomitante ao aumento de AKT fosforilada durante a progressão do CaP, levando a sua forma independente de andrógenos (LIAO et al., 2005). Recentemente, outro trabalho mostrou que a ativação da via AKT reprime a expressão de AR, sugerindo um *crosstalk* entre a via PI3K/AKT/mTOR e a responsividade aos andrógenos (LEE et al., 2014). Todos esses dados nos permitem sugerir, portanto, que a redução de AR no grupo selvagem pós-carcinogênese em relação ao seu controle provavelmente se deve à maior ativação da via AKT/mTOR, regulando negativamente a expressão de AR nesse grupo, como demonstra a literatura. Por outro lado, nossos dados também mostram uma redução significativa nos níveis de AR na próstata dos animais TNFR-1<sup>-/-</sup> que passaram pela carcinogênese. Entretanto esse grupo, devido à redução da ativação de mTOR, não deve ter a regulação negativa da via AKT/mTOR descrita acima para o grupo selvagem. Estudos mostraram a crescente perda da expressão de receptores de andrógenos no estroma adjacente às regiões malignas conforme a progressão dos tumores (OLAPADE-OLAOPA et al, 1999; LI et al., 2008; SINGH et al., 2014). Os mecanismos através dos quais esse decréscimo ocorre são de grande complexidade e ainda permanecem por serem elucidados, mas acredita-se que o processo de perda de sensibilidade aos andrógenos ocorra durante ou logo após a carcinogênese (OLAPADE-OLAOPA et al, 1999). Dessa forma, tendo em vista que esses animais foram submetidos ao tratamento com carcinógeno, inclusive com baixa incidência de lesões malignas, não podemos descartar a hipótese de que a diminuição de AR nos animais KO, e também nos WT, tratados com MNU+T seja justificada, ao menos em parte, pela perda da expressão de AR estromal devido ao desenvolvimento de tumores e que a mesma tenha ocorrido de forma independente de TNFR-1. Ademais, é importante destacar que a redução de AR nos animais TNFR-1<sup>-/-</sup> pode atuar juntamente à redução da via AKT/mTOR na diminuição da proliferação celular observada na presente observação.

A carcinogênese e progressão tumoral depende de muitos fatores estimulatórios, além das vias de sinalização para proliferação e sobrevivência celular, como por exemplo o microambiente estromal ao redor do tumor. Durante esse processo as células epiteliais tumorais,

interagindo com células do estroma ao redor e com o auxílio de diversas moléculas que constituem a matriz extracelular (MEC), criam um local favorável à sua proliferação e migração chamado de estroma reativo (BARRON; ROWLEY, 2012). Os fibroblastos e os miofibroblastos são as principais células constituintes do estroma reativo no CaP humano, sendo os responsáveis pela remodelação da matriz através da síntese de colágeno, tenascina, fibronectina e algumas enzimas como as metaloproteínas (TUXHORN et al., 2001; GONÇALVES et al., 2015). Essas enzimas, como a MMP2, tem atraído muita atenção por serem capazes de, através da degradação da MEC, liberarem moléculas ali sequestradas, como fatores de crescimento, desempenhando, assim, papel chave no comportamento celular, crescimento tumoral, invasão celular e metástases (RAO, 2003; BAUVOIS, 2012). Nossos resultados mostram que a carcinogênese aumenta a expressão de MMP2 em WT, entretanto o mesmo não ocorre nos animais TNFR-1<sup>-/-</sup>, que apresentaram redução do conteúdo dessa enzima. Algumas investigações mostram uma forte correlação entre a expressão de TNF- $\alpha$ , o aumento de MMP2 e a progressão de tumores, inclusive exacerbando seu potencial invasivo (CHUANG et al., 2008). Além disso, em células de glioma, a supressão transcricional de MMP2 foi capaz de inibir a ativação de NF $\kappa$ B induzida por TNF- $\alpha$  (KESANAKURTI et al., 2011). Assim, observa-se a influência da expressão de MMP2 na ativação de NF $\kappa$ B por meio do eixo TNF/TNFR-1. Diante desse cenário, podemos dizer que a presença do receptor TNFR-1 pode explicar a elevação de MMP2 ativada nos animais selvagens após a carcinogênese, reforçando o papel desse no maior desenvolvimento tumoral. Por outro lado, mesmo após a carcinogênese, o grupo TNFR1<sup>-/-</sup> apresentou níveis reduzidos de MMP2. Hara e colaboradores (2008) mostraram que o bloqueio de AR diminui a invasão celular em células de linhagem tumoral de próstata através da redução de MMP2 e MMP9, comprovando a regulação da atividade dessa enzima pelo receptor de andrógenos em células de CaP. Assim, hipotetizamos que a redução de MMP2 no grupo TNFR-1<sup>-/-</sup> pós-carcinogênese seja decorrente da redução na expressão de AR apresentada por esse grupo. Da mesma maneira, o grupo *knockout* controle apresenta maior conteúdo de MMP2 devido aos seus níveis mais elevados de AR. Sugerimos ainda que a via TNF- $\alpha$  /TNFR-1 tem papel fundamental na expressão de MMP2, reduzindo seu conteúdo na sua ausência.

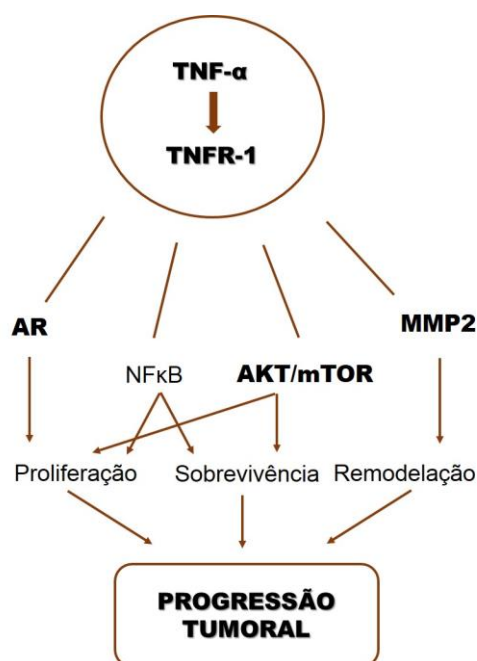
Ainda nesse contexto estromal, de acordo com a literatura, a MMP2 expressa no microambiente tumoral é capaz de clivar, dentre tantos elementos da matriz, a fibronectina, modificando assim a característica adesiva dessa glicoproteína e o potencial migratório das células (KENNY et al., 2008). Portanto, sugerimos que o aumento substancial de fibronectina encontrado em nossos animais *knockout* pós-carcinogênese seja em consequência da menor

disponibilidade de MMP2 na próstata desse grupo. Além disso, tendo em vista o papel dessa enzima na progressão tumoral, aventamos a hipótese de que a sua diminuição acompanhada do aumento de fibronectina e inalteração da quantidade de colágeno indica ausência de remodelação estromal, refletindo a existência de um mecanismo de “proteção” contra o processo carcinogênico nos camundongos TNFR-1<sup>-/-</sup>. Assim, demonstramos que a via TNF- $\alpha$ /TNFR1- tem influência positiva nos elementos envolvidos na remodelação estromal que pode estimular a carcinogênese na próstata.

## 7 CONCLUSÃO

A figura 11 sintetiza os achados dessa investigação com um esquema de modulação da via TNF- $\alpha$ /TNFR-1 na proliferação celular e progressão tumoral na próstata de camundongos.

Por meio do presente estudo, mostramos que a indução da carcinogênese com o agente químico MNU e testosterona durante o período de 6 meses levou ao desenvolvimento de neoplasia intrapitelial prostática (NIP) e adenocarcinoma na próstata de camundongos C57bl/6. Foi mostrado também que a citocina TNF- $\alpha$ , através de seu receptor TNFR-1, promoveu proliferação e sobrevivência celular por meio da ativação da via AKT/mTOR, o que comprova o papel estimulador de TNF- $\alpha$  no desenvolvimento tumoral. Além disso, sugerimos que a progressão maligna envolvida com a via ativada por TNFR-1 esteja relacionada à expressão de outras proteínas importantes no processo tumorigênico, como AR e MMP2.



**Figura 11** - Modulação da via TNF- $\alpha$ /TNFR-1 na proliferação celular e progressão tumoral na próstata de camundongos. Em negrito, as moléculas estimuladas por TNF- $\alpha$ /TNFR-1 ativando vias que culminam na carcinogênese e progressão tumoral.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABATE-SHEN, C.; SHEN, M. M. Mouse models of prostate carcinogenesis. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 05, 2002.
- AGGARWAL, B. B. et al. Human tumor necrosis factor – production, purification, and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 260, n.4, 1985.
- AGUS, D. B. et al. Prostate cancer cell cycle regulators: response to androgen withdrawal and development of androgen independence. **Journal Of The National Cancer Institute**, v. 91, n. 21, 1999.
- ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science: AAS**, v. 281, 1998.
- BALKWILL, F. Tumor necrosis factor and cancer. **Nature Reviews: Cancer**, v. 09, n. 05, 2009.
- BARRON, D.; ROWLEY, D. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. **Endocrine-related cancer**, v. 19, n. 6, 2012.
- BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1825, n. 2012, 2011.
- BONKHOFF, H.; STEIN, U.; REMBERGER, K. The proliferative function of basal cells in the normal and hyperplastic human prostate. **Prostate**, v. 24, n. 3, 1994.
- BOSLAND, M. C. Animal models for the study of prostate carcinogenesis. **Journal Of Cellular Biochemistry**, v. 50, n. 16H, 1992.
- BRUCHOVSKY, N; WILSON, J. D. The conversion of testosterone to 5-alpha-androstan-17 beta-ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, 1968.
- CARSWELL, E. A. et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **PNAS**, v. 72, n. 09, 1975.
- CHEETHAM, P. J.; KATZ, A. E. Diet and prostate cancer - A holistic approach to management. **Archivos Españoles de Urología**, v. 8, n. 64, 2011.
- CHEN, G.; GOEDDEL, D. V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. **Science: Mapping Cellular Signaling**, v. 296, 2002.
- CHOPRA, D. P. et al. TNF-a-mediated apoptosis in normal human prostate epithelial cells and tumor cell lines. **Cancer Letters**, v. 203, 2004.
- CHUANG, M. et al. Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. **Cancer Science**, v. 99, n. 5, 2008.

- CULIG, Z. et al. Androgen receptor in prostate câncer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 9, 2002.
- CUNHA, G. R. et al. Estrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. **Reproduction, Fertility And Development**, v. 13, n. 4, 2001.
- CUNHA, G. R. Role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and abnormal development of the mammary gland and prostate. **Cancer**, v. 74, n. 3, 1994.
- CUNHA, G. R. The endocrinology and developmental biology of the prostate. The Endocrine Society, v. 8, n. 3, 1987.
- DAMBER, J. E.; AUS, G. Prostate Cancer. **The Lancet**, v.371, 2008.
- DE MARZO, A. M. et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews**, v. 07, 2007.
- DENG, J. et al. TNFR-1 on tumor cells contributes to the sensitivity of fibrosarcoma to chemotherapy. **Protein & Cell**, v. 4, n. 5, 2013.
- DESLYPERE, J. P. et al. Testosterone and 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. **Molecular And Cellular Endocrinology**, v. 88, n. 1-3, 1992.
- DEVIN, A.; COOK, A. et al. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. **Immunity**, v. 12, 2000.
- DUFAU, L. M. Endocrine regulation and communicating functions of the leydig cell. **Annual Review of Physiology**, v. 50, 1988.
- FOCHI, R. A. et al. Progesterone as a morphological regulatory fator of the male and female gerbil prostate. The International Journal of Experimental Pathology, v. 94, n. 6, 2013.
- FREEDMAN, M. et al. Admixture mapping identifies 8q24 as prostate câncer risk locus in African-American men. **Pnas**, v. 102, n. 38, 2006.
- GAIOTTI, D. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes human papillomavirus (HPV) E6/E7 RNA expression and cyclin-dependent kinase activity in HPV immortalized keratinocytes by a ras-dependent pathway. **Molecular Carcinogenesis**, v. 27, n. 2, 2000.
- GAUR, U.; AGGARWAL, B. B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. Biochemical Pharmacology, v. 66, n. 8, 2003.
- GINGRICH, J. R. et al. Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. **Cancer Research**, v. 56, 1996.
- GONÇALVES, B. et al. Key participants of the tumor microenvironment of the prostate: An approach of the structural dynamic of cellular elements and extracellular matrix components during epithelial–stromal transition. **Acta Histochemica**, v. 117, n. 1, 2015.

GONÇALVES, B. F. et al. A new proposed rodent model of chemically induced prostate carcinogenesis: distinct time-course prostate cancer progression in the dorsolateral and ventral lobes. **Prostate**, v. 73, n. 11, 2013.

GONÇALVES, B. F. et al. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (mnu) in gerbils: histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. **Experimental And Molecular Pathology**, v. 88, n. 01, 2010.

GRÖNBERG, H. Prostate cancer epidemiology. **The Lancet**, v. 361, n. 9360, 2003.

HARA, T. et al. Androgen Receptor and Invasion in Prostate Cancer. **Cancer Research**, v. 68, n. 4, 2008.

HÄRKÖNEN, P. L.; MÄKELÄ, S. I. Role of estrogens in development of prostate cancer. **Journal Of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 92, 2004.

HEPPNER, G. H. Tumor heterogeneity. **Cancer Research**, v. 44, n. 6, 1984.

HIIPAKKA, R. A.; LIAO, S. Molecular mechanism of androgen action. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 9, n. 8, 1998.

HORSSSEN, R.; HAGEN; T. L. M.; EGGERMONT, A. M. M. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. **The Oncologist**, v. 11, 2006.

HUDSON, D. L. Prostate epithelial stem cell culture. **Cytotechnology**, v. 42, n. 09, 2003.

HUSS, W. J.; MADDISON, L. A.; GREENBERG, N. M. Autochthonous mouse models for prostate cancer: past, present and future. **Seminars In Cancer Biology**, v. 11, 2001.

HUSSAIN, A. R. Cross-talk between NF-Kb and PI3-Kinase/AKT pathway can be targeted in primary effusion lymphoma (PEL) cell lines for eficiente apoptosis. **PLoSOne**, v.7, n.6, 2012.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Estimativa 2014: Incidência de câncer no brasil.** Introdução. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=2>> Acesso em: 05 ago 2015.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Tipos de câncer: Próstata.** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>> Acesso em: 05 ago 2015.

ISAACS, J. T.; COFFEY, D. S. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. **The Prostate**, v. 2, 1989.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, 2011.

JIN, R. et al. NF-kB gene signature predicts prostate cancer progression. **Molecular and Cellular Pathobiology**, v. 74, n. 10, 2014.



KANG, HONG-YO et al. Mechanisms And Clinical Relevance Of Androgens And Androgen Receptor Actions. **Chang Gung Medical Journal**, v. 26, n. 6, 2003.

KENNY, H. et al. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, 2008.

KESANAKURTI, D. et al. Suppression of MMP-2 Attenuates TNF- $\alpha$  Induced NF- $\kappa$ B Activation and Leads to JNK Mediated Cell Death in Glioma. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.

KIERZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. Transporte e maturação de espermatozoides. In: \_\_\_\_\_. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. Cap. 21, p. 625.

KNIGHT, B. et al. Impaired Preneoplastic Changes and Liver Tumor Formation in Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 Knockout Mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 12, 2000.

LEBREC, H.; PONCE, R. Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor inhibition, and cancer risk. **Current Medical Research & Opinion**, v. 31, n. 3, 2015.

LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of Prostate Anatomy, Histology and Pathology. **Endocrinology And Metabolism Clinics Of North America**, v. 40, n. 3, 2011.

LEE, S. et al. Crosstalking between Androgen and PI3K/AKT Signaling Pathways in Prostate Cancer Cells. **Journal of Biological Chemistry**, 2014.

LEITZMANN, M.; ROHRMANN, S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. **Clinical Epidemiology**, v. 4, 2012.

LI, Y. et al. Decrease in stromal androgen receptor associates with androgen-independent disease and promotes prostate cancer cell proliferation and invasion. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6b, 2008.

LIAO, Z. et al. Increased phospho-AKT is associated with loss of the androgen receptor during the progression of N-methyl-N-nitrosourea-induced prostate carcinogenesis in rats. **The Prostate**, v. 64, n. 2, 2005.

LONG, R. M. et al. Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. **Clinical Science**, v. 108, 2005.

LU, T.; SATRK, G. R. Cytokine Overexpression and constitutive NF- $\kappa$ B in cancer. **Cell Cycle**, v. 3, n. 9, 2004.

LUCIA; M. S.; TORKKO, K. C. Inflammation as a target for prostate cancer chemoprevention: pathological and laboratory rationale. **The Journal of Urology**, v. 171, 2004.

MARKER, P. C. et al. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental Biology**, v. 253, n. 2, 2003.

McNEAL, J. E. Anatomy of the prostate and morphogenesis of BHP. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 145, 1984.

McNEAL, J. E. Normal histology of the prostate. **The American Journal Of Surgical Pathology**, 1988.

McPHERSON, S. J. et al. Essential Role for Estrogen Receptor  $\beta$  in Stromal-Epithelial Regulation of Prostatic Hyperplasia. **Endocrine Press**, v. 148, n. 2, 2007.

MIZOKAMI, A. et al. Tumor necrosis factor alpha represses androgen sensitivity in the LNCaP prostate cancer cells. **The Journal of Urology**, v. 164, 2000.

MOCELLIN, S. et al. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 16, 2005.

MOORE, R. et al. Mice deficient in tumor necrosis factor- $\alpha$  are resistant to skin carcinogenesis. **Nature Medicine**, v. 5, n. 7, 1999.

MUNDIT, A. J. et al. A phase I trial of TNFerade biologic in patients with soft tissue sarcoma in the extremities. **Clinical Cancer Research**, v. 10, 2004.

NELSON, W. G. et al. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. **The Journal Of Urology: Educational articles**, v. 172, n. 9, 2004.

NGUYEN, D. P. et al. Recent insights into NF- $\kappa$ B signalling pathways and the link between inflammation and prostate cancer. **BJU International**, v. 114, 2014.

NOBLE, R. L. The development of prostatic adenocarcinoma in Nb rats following prolonged sex hormone administration. **Cancer Research**, v. 37, 1977.

NOWELL, P. C. Mechanisms of Tumor Progression. **Cancer Research**, v. 46, n. 5, 1986.

O'MALLEY, W. E.; ACHINSTEIN, B.; SHEAR, M. J. Action of bacterial polysaccharide on tumors. II. Damage of sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide, and induced tolerance. **Journal Of The National Cancer Institute**, v. 29, n. 6, 1962.

OLAPADE-OLAOPA, E. O. et al. Malignant transformation of human prostatic epithelium is associated with the loss of androgen receptor immunoreactivity in the surrounding stroma. **Clinical Cancer Research**, v. 5, 1999.

OLUMI, A. F. et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. **Cancer Research**, v. 59, n. 19, 1999.

OSHIMA, H. et al. TNF- $\alpha$ /TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of Nox1 and Gna14 in tumor cells. **Oncogene**, v. 33, n. 29, 2014.

OZES, O. N. et al. NF- $\kappa$ B activation by tumor necrosis factor requires the AKT serine-threonine kinase. *Letters to Nature*, v. 401, 1999.

PEIXOTO, A. R. et al. Gestational and lactational exposition to Di-N-butyl-phthalate (DBP) increases inflammation and preneoplastic lesions in prostate of wistar rats after carcinogenic N-methyl-N-nitrosourea (MNU) plus testosterone protocol. **Environmental Toxicology**, 2015.

PENG, C. et al. TNFR-1 regulates ovarian cancer cell tumorigenicity through PIK3CB-p110BETA. *Current Molecular Medicine*, v. 15, n. 5, 2015.

PIENTA, K. J. et al. The current state of preclinical prostate cancer animal models. **Prostate**, v. 68, n. 06, 2008.

POLIGONE, B. et al. A Role for NF- $\kappa$ B Activity in Skin Hyperplasia and the Development of Keratoacanthomata in Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

POPIVANNOVA, B. et al. Blocking TNF- $\alpha$  in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. **Journal of Clinical Investigation**, 2008.

RAO, J. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 7, 2003.

RIBEIRO, D. L. et al. Cellular changes in the prostatic stroma of glucocorticoid-treated rats. *Cell and Tissue Research*, v. 332, n. 3, 2008.

RIBEIRO, D. L. et al. High-fat diet obesity associated with insulin resistance increases cell proliferation, estrogen receptor, and PI3K proteins in rat ventral prostate. *Journal of Andrology*, v. 33, n. 5, 2012.

RICKE, W. A. et al. Steroid hormones stimulate human prostate cancer progression and metastasis. **International Journal Of Cancer**, v. 118, 2006.

ROY-BURMAN, P. et al. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. **Endocrine-related Cancer**, v. 11, 2004.

RUSSEL, D. W.; WILSON, J. D. Steroid 5 $\alpha$ -Reductase: Two Genes/Two Enzymes. **Annual Review Of Biochemistry**, v. 63, 1994.

SABIO, G; DAVES, R. J. TNF and MAP kinase signalling pathways. **Elsevier: Seminars in Immunology**, 2014.

SHAPPELL, S. B. et al. Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification: The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. **Cancer Research**, v. 64, 2004.

SHARMILA, G. et al. Chemopreventive Effect of Quercetin in MNU and Testosterone Induced Prostate Cancer of Sprague-Dawley Rats. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 1, 2013.

SHIRAI, T. et al. Experimental prostate carcinogenesis — rodent models. **Elsevier: Mutation Research**, v. 462, 2000.

SIEGEL, R.; MILLER, K.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 1, 2015.

SINGH, M. et al. Stromal androgen receptor in prostate development and cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 184, n. 10, 2014.

SOBEL, R. E.; SADAR, M. D. Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines – part 2. **The Journal of Urology**, v. 173, n. 2, 2005.

STILLIE, R.; SAPP, H.; STADNYK, A. TNFR1 Deficiency Protects Mice from Colitis-Associated Colorectal Cancer Coupled with a Decreased Level of Oxidative Damage in the Colon: Implications for Anti-TNF Therapy of Unremitting Colitis. **Journal of Cancer Therapy**, v. 03, 2012.

STRASNER, A.; KARIN, M. Immune infiltration and prostate cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 5, 2015.

SUGIMURA, Y.; CUNHA, G. R.; DONJACOUR, A. A. Morphological and histological study of castration-induced degeneration and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. **Biology of Reproduction**, v. 34, 1986.

SUTHERLAND, S. et al. Expression of phosphorylated-mTOR during the development of prostate cancer. **The Prostate**, v. 74, n. 12, 2014.

TAKADA, H. et al. Role of SODD in regulation of tumor necrosis factor responses. **Molecular And Cellular Biology**, v. 23, n. 11, 2003.

TAYLOR, W. et al. p27Kip1 deficiency promotes prostate carcinogenesis but does not affect the efficacy of retinoids in suppressing the neoplastic process. **BMC Cancer**, v. 10, n. 1, 2010.

THIGPEN, A. E. et al. Tissue Distribution and Ontogeny of Steroid 5 $\alpha$ -Reductase Isozyme Expression. **The Journal Of Clinical Investigation**, v. 92, 1993.

THOMPSON, T. C. et al. Transgenic Models for the Study of Prostate Cancer. **Cancer Supplement**, v. 71, n. 3, 1993.

TIMMS, B. G.; MOHS, T. J.; DIDIO, L. J. Ductal budding and branching patterns in the developing prostate. **Journal of Urology**, v. 151, n. 5, 1994.

TINDALL, E. A. et al. Addressing the contribution of previously described genetic and epidemiological risk factors associated with increased prostate cancer risk and aggressive disease within men from South Africa. **Bmc Urology**, v. 13, n. 74, 2013.

TROIANI, T. et al. The use of xenograft models for the selection of cancer treatments with the EGFR as an example. **Elsevier: Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 65, 2008.

TSE, B.; SCOTT, K.; RUSSELL, P. Paradoxical Roles of Tumour Necrosis Factor-Alpha in Prostate Cancer Biology. **Prostate Cancer**, v. 2012, 2012.

TU, S. M.; LIN, S. H. Prostate cancer cells. **Clinical Genitourinary Cancer**, v. 10, n. 2, 2012.

TUXHORN, J. A.; AYALA, G. E.; ROWLEY, D. R. Reactive stroma in prostate cancer progression. **The Journal of Urology**, v. 166, n. 6, 2001.

UZGARE, A. R.; ISAACS, J. T. Prostate cancer: potential targets of anti-proliferative and apoptotic signaling pathways. **Biochemistry And Cell Biology**, v. 37, 2005.

VALKENBURG, K. C.; WILLIAMS, B. O. Mouse models of prostate cancer. **Prostate Cancer**, v. 2011, 2011.

VERMA, S.; BAHORUN, T.; KUMAR, A. N-methyl N-nitroso Urea induced altered DNA structure initiate hepatocarcinogenesis. **Preventive Medicine**, v. 54, 2012.

WAJANT, H. Death receptors. **Essays In Biochemistry**, v. 39, 2003.

WALCZAK, H. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. **Immunological Reviews**, v. 244, 2011.

WANG, C. Y.; MAYO, M. W.; BALDWIN Jr, A. S. TNF and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- $\kappa$ B. **Science**, v. 274, n.5288, 1996.

WANG, Y. et al. Sex hormone-induced carcinogenesis in Rb-deficient prostate tissue. **Cancer Research**, v. 60, 2000.

WANG, Y. et al. A human prostatic epithelial model of hormonal carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 61, n. 09, 2001.

World Health Organization (WHO). **Cancer: key facts**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> Acesso em 09 ago. 2015.

WU, S. et al. Tumor necrosis factor alpha as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor alpha expression. **Cancer Research**, v. 53, 1993.

XUE, L. et al. Induced hyperproliferation in epithelial cells of mouse prostate by a Western-style diet. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 5, 1997.

ZANATELLI, M. et al. Actions of oestradiol and progesterone on the prostate in female gerbils: reversal of the histological effects of castration. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 4, 2014.

ZHENG, S. L. et al. Cumulative association of five genetic variants with prostate cancer. **The New England Journal Of Medicine**, v. 9, n. 358, 2008.

ZHU, G. et al. TNF- $\alpha$  promotes gallbladder cancer cell growth and invasion through autocrine mechanisms. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 33, n. 6, 2014.