



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

AMANDA RODRIGUES CRUZ

**PAPEL DO RECEPTOR 1 DO TNF- α NA PROLIFERAÇÃO
CELULAR E ELEMENTOS ESTROMAIS DA PRÓSTATA DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À CARCINOGENESE**

UBERLÂNDIA

2017

AMANDA RODRIGUES CRUZ

**PAPEL DO RECEPTOR 1 DO TNF- α NA PROLIFERAÇÃO
CELULAR E ELEMENTOS ESTROMAIS DA PRÓSTATA DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À CARCINOGENESE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Nutrição da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
Nutricionista.

ORIENTADOR: PROFA. DRA. DANIELE LISBOA RIBEIRO

UBERLÂNDIA

2017

DEDICATÓRIA

A todos que estiveram presentes
em todos esses anos de faculdade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e meu irmão, por sempre me apoiarem em qualquer empreitada acadêmica que eu escolhesse e por sempre respeitarem minhas decisões e estarem presentes.

À professora Daniele, por ter significado e ainda continuar significando, nesses 5 anos de graduação, um local de aprendizado, inspiração, crescimento profissional, crescimento pessoal, conforto, carinho e amizade. Agradeço a ela pela paciência e espero que eu consiga ser pelo menos metade da profissional que ela é.

À Raquel, por ter tido paciência e me ensinado as rotinas de laboratório, possibilitando que eu conhecesse as técnicas e protocolos do projeto. Por ter sido uma amiga, companheira de laboratório e de momentos da vida.

Aos professores colaboradores do projeto, por toda ajuda, paciência e auxílios.

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

À secretária da Histologia Juscélia, por sempre nos tirar um sorriso e dizer palavras animadoras tanto nos momentos bons, quanto naqueles em que tudo dava errado.

Aos amigos da universidade e de fora dela que sempre estiveram presentes e foram fundamentais em todo esse processo, principalmente a Migs que escutou todos os inúmeros mimimis ao longo desses anos.

Aos professores que de alguma forma me marcaram durante essa vivência acadêmica e que terei como inspiração ética e profissional.

Às professoras Dr^{as}. Tatiana Tomiosso e Françoise Botelho por aceitarem participar desse trabalho como banca, trazendo suas contribuições ao estudo.

RESUMO

O receptor 1 do TNF- α está relacionado na literatura com uma atuação paradoxal na carcinogênese prostática: apoptose/morte e proliferação/sobrevivência celular. Em vista disso, é importante tentar esclarecer por meio de um modelo knockout de TNFR-1 como é o seu real efeito nesse tipo de câncer, sendo esse o objetivo desse estudo. Para isso, foi realizada a indução da carcinogênese prostática em camundongos C57bl/6 selvagens (SM) e knockout (KO) com o carcinógeno N-nitroso-N-metilureia (MNU) em uma dose única seguido de doses semanais por seis meses de testosterona em óleo mineral como veículo. O grupo controle recebeu apenas doses semanais de óleo mineral. Como resultado dessa indução, os grupos desenvolveram diversos tipos de lesões, sendo que o grupo controle apresentou apenas lesões benignas, enquanto o grupo tratado apresentou benignas e malignas. Estas últimas foram mais incidentes nos animais SM do que nos KO, sugerindo que há uma relação de proliferação/sobrevivência quando o TNF- α se liga ao seu receptor 1. Tal resultado vai de encontro com os achados em relação à proliferação celular que foi maior nos animais SM do que nos animais KO. Em relação ao compartimento estromal, notamos que não há alteração de colágeno entre os grupos, entretanto há um aumento de fibronectina nos camundongos KO, seja do grupo controle seja do grupo carcinogênese. Esses dados indicam baixa remodelação estromal nesse grupo o que justifica a menor incidência de câncer nos knockout. Assim, esclarecendo o paradoxo investigado, concluímos que ao se ligar ao seu receptor 1, a citocina TNF- α age promovendo a proliferação e sobrevivência celular e a deposição de fibronectina, eventos que podem estimular a progressão do câncer de próstata em camundongos.

Palavras chave: TNFR-1. Carcinogênese próstata.

ABSTRACT

In the literature, TNF- α receptor 1 is related with a paradoxical action in prostate carcinogenesis: apoptosis/death or cell proliferation/survival. Therefore, it is important to clarify its real effect on this type of cancer by using an TNFR-1 knockout model, which was the purpose of this study. In this regard, the induction of prostatic carcinogenesis in mice C57bl/6 wild type (SM) and TNFR-1 knockout (KO) was performed with the carcinogen N-nitroso-N-methylurea (MNU) in a single dose followed by weekly doses of testosterone for six months, using mineral oil as a vehicle. The control group received only weekly doses of mineral oil. As a result of this induction, mice developed several types of lesions, where the control group presented only benign lesions, while MNU treated group presented benign and malignant lesions. Malignant lesions were more incidental in SM animals than in KO ones, suggesting that there is a proliferation/survival relationship when TNF- α binds to its receptor 1. This is consistent with the findings regarding cell proliferation that was higher in SM than in KO animals. In relation to the prostate stromal compartment, we found that there was no collagen alteration between the evaluated groups, however, there was an increase in fibronectin distribution in KO mice, in both the control and the carcinogenesis group. These data indicate a low stromal remodeling process in this group, which justifies the lower incidence of knockout cancer. Therefore, when it binds to its receptor 1, the cytokine TNF- α acts to promote cell proliferation and survival and the expression of fibronectin, activities which can favour prostate cancer progression in mice.

Key words: TNFR-1. Prostate carcinogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Divisão anatômica da próstata humana e de camundongo.....	10
Figura 2 – Células epiteliais do tecido prostático.....	12
Figura 3 – Interações epitélio-estroma prostáticos.....	12
Figura 4 – Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna da próstata por 100mil homens, estimadas para o ano de 2016 por cada Unidade da Federação.....	14
Tabela 1 – Média do peso corporal e do peso do complexo prostático de camundongos selvagens (SM) e TNFR1-knockout (KO) dos grupos controle e tratado para carcinogênese.....	23
Figura 4 – Visão geral de corte histológico da região mediana do complexo prostático, mostrando lobos típicos envolvendo a uretra.....	25
Figura 6 – Fotomicrografias da próstata dorsolateral de camundongos selvagem (SM) e TNFR1-knockout (KO) dos grupos controles (SM e KO) e tratados com o carcinógeno (SMT e KOT): características histológicas coloração com H.E.....	26
Tabela 2 – Porcentagens de incidência e frequência dos vários tipos de lesões encontradas nos animais selvagens (SM) e TNFR1-knockout (KO) após a indução da carcinogênese (T).....	27
Tabela 3 – Médias e desvio padrão das contagens de células PCNA-positivas e sua frequência relativa (% em relação ao total de células encontradas) na região dorsolateral da próstata de camundongos selvagens (SM) e TNFR1-knockout (KO) controles e após carcinogênese química.....	28
Figura 7 – Fotomicrografias da próstata dorsolateral do grupo selvagem (SM) e TNFR1-knockout (KO), controles (SM e KO) e tratados com o carcinógeno (SMT e KOT): Imunohistoquímica para PCNA mostrando células proliferativas.....	29
Figura 8 – Fotomicrografias da próstata dorsolateral do grupo selvagem (SM) e TNFR1-knockout (KO), controles (SM e KO) e tratados com o carcinógeno (SMT e KOT): Distribuição de colágeno em cortes corados com Picrosírius-Hematoxilina.....	30
Figura 9 - Fotomicrografias da próstata dorsolateral do grupo selvagem (SM) e TNFR1-knockout (KO), controles (SM e KO) e tratados com o carcinógeno (SMT e KOT): Imunohistoquímica para fibronectina	32

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Receptor de andrógeno
BSA	Albumina de soro bovino
CaP	Câncer de próstata
DHT	Di-hidrotestosterona
MEC	Matriz extracelular
MNU	N-nitroso-N-metilureia
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
TBST	Tampão tris-salinico e tween 20
TNFR-1	Receptor do fator de necrose tumoral tipo 1
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
Características da próstata	10
Câncer de próstata	15
Inflamações prostáticas e sua relação com o câncer.....	16
Fator de necrose tumoral alfa como um precursor do câncer de próstata	16
Indução da carcinogênese.....	17
2 OBJETIVOS	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
Delineamento experimental e indução da carcinogênese	20
Análise morfológica	20
Análises imunohistoquímicas	21
Quantificação dos elementos estromais.....	21
Análise estatística	22
4 RESULTADOS	23
Análises Biométricas	23
Análise histológica	23
Análise histopatológica	27
Análise de proliferação celular	27
Análise da distribuição de colágeno e fibronectina	30
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÃO	37
7 REFERÊNCIAS.....	3Erro! Indicador não definido.8
8 ANEXO	4Erro! Indicador não definido.4
Artigo.....	44

1. INTRODUÇÃO

Características da próstata

A próstata é uma glândula genital acessória do sistema reprodutor masculino, responsável por produzir um fluido fundamental para a eficácia dos espermatozoides na fecundação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A próstata humana tem um formato cônico e rodeia a uretra proximal à medida que cresce da bexiga, sendo classicamente caracterizada como “em forma de noz”. É uma glândula exócrina do sistema reprodutor masculino composta de elementos estromais e glandulares, extremamente conectados e cercados de uma pseudocapsula. Esta, internamente, é formada por uma musculatura lisa e, externamente, por colágeno (LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAUM, 2011; McNEAL et al, 1986; McNEAL, 1972). Anatomicamente a próstata humana é dividida em 3 zonas: central, de transição e periférica. Elas se diferenciam por serem, durante a formação embriológica, originadas de locais distintos e terem seu aspecto histológico, anatômico, funções biológicas e susceptibilidade a distúrbios patológicos diferentes (McNEAL, 1988) (Figura 1).

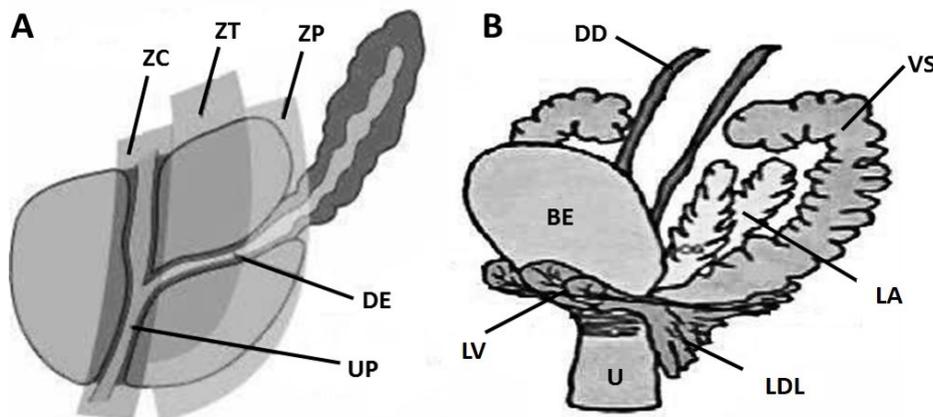


Figura 1 - Divisão anatômica da próstata humana e de camundongos. A- Próstata humana: ZC – Zona Central; ZT – Zona de Transição; ZP – Zona Periférica; DE – Ducto Ejaculatório; UP – Uretra Prostática. B- Próstata de camundongo: BE – Bexiga; U – Uretra; DD – Ducto Deferente; VS – Vesícula Seminal; LV – Lobo Ventral; LDL – Lobo Dorsolateral; LA – Lobo Anterior (glândula coaguladora). Adaptado de: Pathology outlines <<http://www.pathologyoutlines.com/topic/prostatehistology.html>> Acesso em 01 dez 2017 (A); SUGIMURA; CUNHA; DONJACOUR, et al., 1986 (B).

Já a próstata de roedores é organizada em 4 estruturas lobulares distintas, denominadas: ventral, anterior, dorsal e lateral; sendo que, normalmente, essas últimas

duas são coletivamente denominadas dorsolateral. Cada lobo possui funções histológicas e fisiológicas específicas. O lobo dorsolateral de roedores é o que mais se assemelha à região periférica da próstata humana, sendo esta a de incidência mais comum de câncer de próstata (McNEAL, 1969; CUNHA; RICKE, 2011). Apesar das diferenças anatômicas observadas entre as estruturas prostáticas de humanos e camundongos, as semelhanças na funcionalidade e histologia corroboram com a utilização de modelos geneticamente modificados de roedores para estudar as modificações no Câncer de Próstata (SHAPPELL et al, 2004).

Histologicamente, a próstata é caracterizada por ser um conjunto de glândulas túbulo-alveolares, formado de um epitélio secretor envolto de um estroma. O epitélio secretor das unidades glandulares apresentam células luminais, células basais, células de amplificação transitória (“transit-amplifying cells”) e células neuroendócrinas (TUXHORN et al, 2001; AUMÜLLER; SEITZ, 1990). As células luminais são responsáveis pela secreção do líquido prostático, tendo, portanto, em sua constituição abundância de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi. Já as células intermediárias e de amplificação transitória atuam auxiliando na proliferação e diferenciação das células luminais. Por fim, na função de renovação epitelial agem as células basais e tronco (AUMÜLLER, 1983) (Figura 2). O estroma que envolve as glândulas é composto pela lâmina basal, capilares sanguíneos, fibroblastos, células musculares lisas, células do tecido conjuntivo, terminações nervosas, vasos linfáticos. Sabe-se que o complexo estromal age gerando sinalizações biológicas que promovem alterações e ações nas células epiteliais, sendo assim, compreensível que essa interação epitélio-estroma seja caracterizada como uma unidade funcional da glândula (TUXHORN et al, 2001; AUMÜLLER; SEITZ, 1990) (Figura 3).

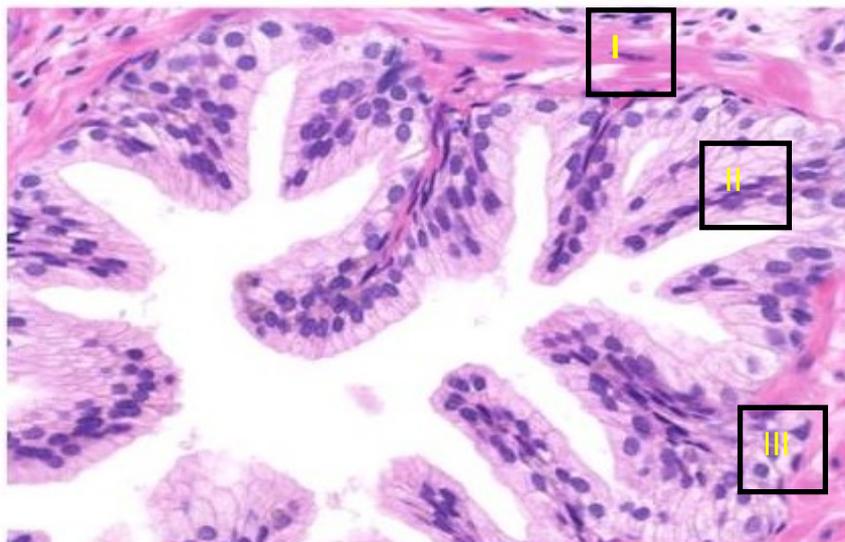


Figura 2 – Células epiteliais do tecido prostático. I- estroma fibromuscular II- células luminiais III- células basais. Adaptado de Pathology outlines <<http://www.pathologyoutlines.com/topic/prostatehistology.html>>.

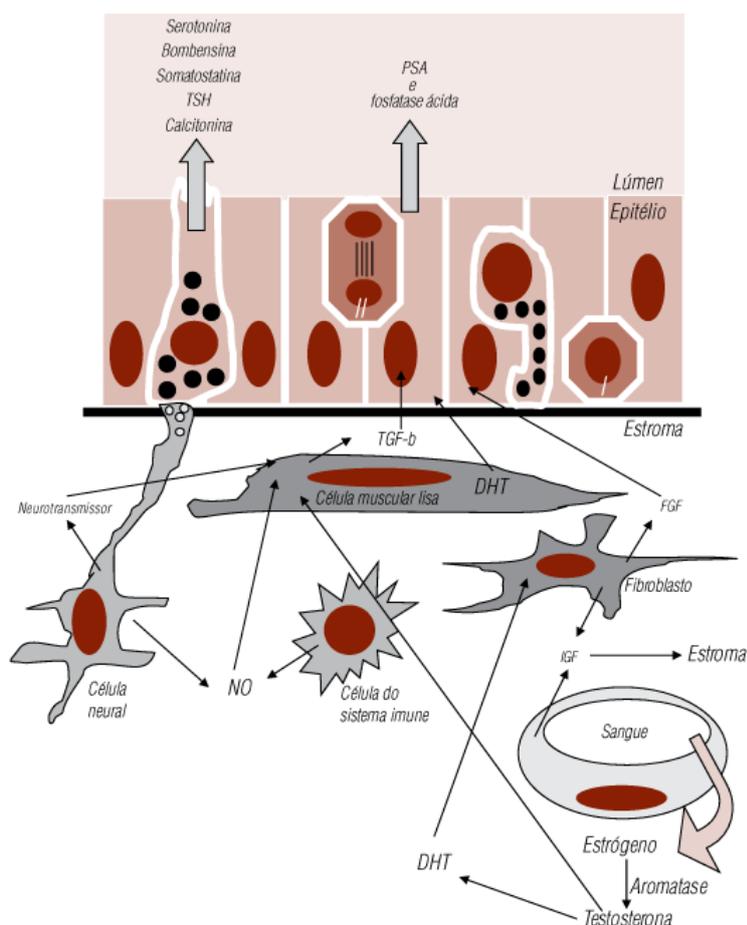


Figura 3 – Interações epitélio-estroma prostático. FGF- β – fator de crescimento β ; DHT – diidrotestosterona; NO – óxido nítrico; FGF – fator de crescimento fibroblástico; PSA – antígeno prostático específico; I – célula basal; II – célula em divisão. Adaptado de TOBOGA; VILMAIOR; GÓES, 2009.

De acordo com Isaacs e Coffey (1989), tanto para um desenvolvimento normal da próstata quanto para o seu funcionamento, são necessários hormônios androgênicos, principalmente a Testosterona em sua forma hidroxilada (diidrotestosterona – DHT). Estes atuam diretamente e indiretamente nesse tecido promovendo diferenciação e proliferação das células epiteliais. Essa atuação direta se dá por meio dos receptores androgênicos (AR) específicos presentes nessa glândula, pelo qual a DHT tem uma alta afinidade. Já a atuação indireta relaciona-se com estímulo à secreção de fatores de crescimento, como: epidermal, de queratinócitos, de fibroblastos e o tipo insulina que agem tanto no epitélio quanto no estroma (GRIFFITHS; DENNIS, 1997). Outros tipos de hormônios também participam do controle dessas funções, como os estrogênios que colaboram com a proliferação das células em consonância com os androgênios. Quando não há um equilíbrio entre esses hormônios, podem surgir as neoplasias e a inflamação prostática (KOIVISTO, 1997; TOBOGA; VILAMAIOR; GÓES, 2009; TUXHORN et al., 2002).

Câncer de próstata

O câncer de próstata é uma enfermidade que apresenta um risco estimado de 600 mil novos casos no Brasil entre 2016-2017. Além disso, à exceção do câncer de pele não melanoma, o câncer de próstata será um dos mais frequentes perfazendo 28,6% (61 mil casos) de todos os novos casos em homens e o mais incidente em todas as regiões do país (INCA, 2015). Ademais, é considerado um problema de saúde pública por alguns pesquisadores, já que tem grande relevância em relação à morbimortalidade de homens em todo o mundo (GOMES, 2008). Dessa forma, é preciso que as causas dessa doença sejam mais estudadas e esclarecidas, de forma que as medidas de prevenção e tratamento tornem-se cada vez mais eficazes.

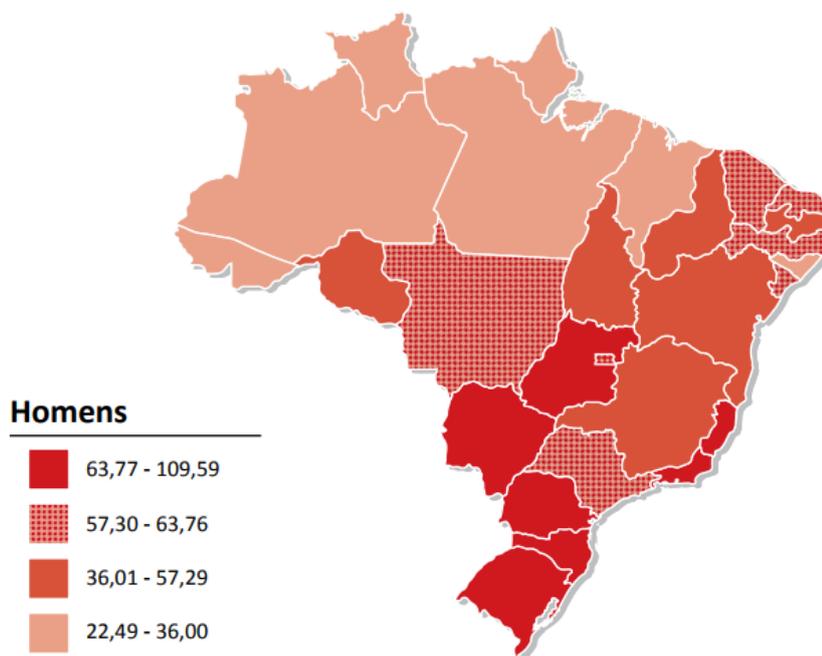


Figura 4 – Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna da próstata por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2016 por cada Unidade da Federação. INCA, 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>> Acesso em 01 dezembro de 2017.

Sabe-se que as neoplasias são resultados de um ineficaz funcionamento de alguns genes e isso pode ser causado por herança (câncer hereditário), fatores carcinogênicos (câncer esporádico) ou mecanismos epigenéticos. No caso da próstata, algumas regiões cromossômicas já foram mapeadas por serem, frequentemente, desativadas: genes supressores tumorais; e outras ativadas: oncogenes (DONG, 2001).

Além disso, a maior parte dos carcinomas, assim como o de próstata, está relacionada com algum tipo de reação no compartimento estromal do tecido. Essa reação caracteriza-se por uma alteração no fenótipo das células, na matriz extracelular e na proliferação estromal. Isso ocorre como um mecanismo de remodelação tecidual, com a intenção de manter a homeostase do local. No caso do câncer, essa remodelação ocorre induzida pela quebra do equilíbrio tecidual em função das células epiteliais carcinogênicas (ROWLEY, 1999). Vários estudos, dentre eles o de Tuxhorn e colaboradores (2002), mostram que essa alteração no estroma prostático serve de base para o crescimento, progressão, sobrevivência, proliferação e invasão das células do câncer. É o microambiente, o qual apresenta miofibroblastos que sintetizam colágeno I, colágeno II, fibronectina, tenascina e versican que proporcionam um ambiente favorável ao crescimento e progressão do câncer de próstata.

Nesse contexto de remodelação tecidual, quando observamos a matriz extracelular destacam-se 2 componentes que foram de interesse para esse estudo: colágeno e fibronectina. O primeiro, segundo Iwasaki e colaboradores (2012) é o alicerce extracelular para todos os seres multicelulares, atuando em funções estruturais e morfogênicas essenciais na matriz e membrana basal de diversos tecidos. A fibronectina, por sua vez, é uma glicoproteína adesiva, tendo um papel na adesão, diferenciação e migração celular (ARMSTRONG, 2000).

Vários trabalhos como os de Li e outros (2010), Koenig e outros (2006) e Kakkad e outros (2012) mostram, em uma diversidade de tumores, a relação das fibras colágenas com diminuída adesão celular e progressão tumoral, até mesmo em situação de metástase. Esse papel na progressão tumoral também é apontado em trabalhos sobre a fibronectina e o câncer, sendo associada a migração celular e maior movimentação de células tumorais, que favorecem a metástase, quando sua deposição na célula diminui (MOHRI, 1996; KOSMEHL et al., 1999).

Atualmente, sabe-se que essa neoplasia está relacionada com diversos fatores de risco como: envelhecimento, histórico familiar, descendência e o ambiente (modo de vida) (SFANOS; DE MARZO, 2011). De acordo com Sethi e colaboradores (2012), os caminhos moleculares por meio dos quais os fatores de risco levam ao câncer ficam cada vez mais claros e demonstram que um processo inflamatório é comum a todos eles.

Inflamações prostáticas e sua relação com o câncer

Rudolf Virchow observou em 1863, que os arredores de um tecido cronicamente inflamado promove um ambiente celular propício para o desenvolvimento de tumores (ARGGARWAL; VIJAYALEKSHMI; SUNG, 2009). A partir disso, a relação entre inflamações e tumores foi melhor estudada. O mecanismo para o desenvolvimento de câncer, quando há inflamação crônica, está relacionado com a presença de vários mediadores pró-inflamatórios como: citocina, quimiocinas, oncogenes, além da ativação de fatores de transcrição como o NF-kB (fator nuclear kB) (SETHI et al., 2012). Esses servem de mediadores imediatos para a resposta ao estresse oxidativo induzido pelo processo inflamatório. Eles agem em conjunto com uma indução de COX-2 e iNOS (óxido nítrico sintase), uma exagerada expressão de citocinas inflamatórias, interleucinas, quimiocinas e alterações na expressão de específicos microRNAs (REUTER, 2010).

Os mecanismos relacionados à inflamação podem levar a um prejuízo dos tecidos vizinhos e saudáveis, tanto de células epiteliais, quanto estromais. Se essa situação é contínua por um longo período de tempo pode levar a carcinogênese (FEDERICO et al., 2007). Entretanto, ainda não se sabe ao certo qual é o papel de cada um desses mediadores pró-inflamatórios no crescimento e sobrevivência dos tumores, angiogênese, invasão tecidual e metástase (HOUGHTON; UCHI; WOLCHOK, 2005). Corroborando a ligação entre inflamação e câncer de próstata, De Marzo e outros (2007), mostram que na Atrofia Inflamatória Proliferativa (PIA), lesão prostática atrófica focal, existem células com muita capacidade para se dividir, mas que não conseguem se diferenciar e secretar. Além disso, percebe-se que a PIA tem uma capacidade de originar neoplasia intraepitelial (PIN) e o câncer prostático, já que nela são encontradas vias moleculares, alteradas igualmente, em todas essas doenças. É nesse sentido, que muitos estudos como o de Narayanan e outros (2009), vêm buscando descobrir como drogas anti-inflamatórias e antioxidantes podem ser uma eficaz forma de tratamento para reduzir o desenvolvimento de tumores prostáticos e mesmo preveni-los.

Fator de Necrose Tumoral Alfa como um precursor do câncer de próstata

Quando o fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) foi descoberto em 1975 pelo Dr. Lloyd Old e posteriormente clonado em 1984, via-se nessa molécula um poder de impedir a progressão de alguns tipos de câncer, visto que tinha a habilidade de matar células cancerígenas em tecidos de roedores (CARSWELL et al., 1975; PENNICA et al., 1984; GAUR; AGGARWAL, 2003). Entretanto, estudos mais profundos sobre a atividade dessas citocinas revelaram uma contraditória função de promover o câncer, já que participa dos processos inflamatórios (LIN; KARIN, 2007).

O TNF é uma das mais importantes citocinas pleiotrópicas que participa de respostas inflamatórias e imunológicas. Nos últimos anos, descobriu-se um número crescente de tipos de moléculas pertencentes à superfamília TNF, que, atualmente, tem 19 membros, cada um deles com um receptor correspondente específico para iniciar suas respectivas funções celulares. Essa citocina é sintetizada por uma proteína precursora, composta de 233 aminoácidos que é clivada por uma metaloproteinase específica chamada TACE (TNF- α converting enzyme), que leva a formação de um composto monomérico solúvel com 157 aminoácidos não-glicosilados (BLACK et al., 1997). Além disso, o TNF é produzido por macrófagos ativados e pode também ser

secretado por outros tipos celulares como células T, queratinócitos e células de alguns tipos de carcinomas (BRINKMAN et al., 1997).

O TNF pode interagir com dois tipos de receptores: TNFR1 e o TNFR2 e com cada um deles o processo molecular desencadeado é diferente (McDERMOTT, 2001).

O TNF- α pode ter um efeito pró-inflamatório, quando, via TNFR1, ativa o fator nuclear κ B (NF- κ B) e induz a expressão de genes relacionados com a inflamação, supressão da apoptose, sobrevivência, proliferação, carcinogênese, angiogênese e metástase (KIM, KELLY, 2011). Ao mesmo tempo, outros estudos mostram que dependendo das condições celulares em que se encontra e qual dos dois tipos de receptores foi ativado, essa citocina pode estimular a apoptose, através da participação de mitocôndrias e liberação de citocromo c, ativando caspase-9 e caspase-3 e, por fim, a morte da célula (ASHKENAZI; DIXIT, 1998). É essa propriedade de induzir a apoptose que fez com que se acreditasse no poder anti-tumoral do TNF- α . Entretanto, ainda não se sabe com total clareza quais são os caminhos moleculares que levam o TNF- α a participar ora como um agente cancerígeno e ora como um agente anti-neoplásico.

Embora o TNFR2 seja mais restritamente expresso pelas células inflamatórias, a maior parte das células humanas expressam o TNFR-1, sendo um receptor muito estudado devido ao papel paradoxal que desempenha, já que tem essa associação tanto aos eventos de morte celular, como também de ativação das vias de proliferação e crescimento celular (ASHKENAZI et al., 1998; CHEN; GOEDDEL, 2002). No que tange ao mecanismo de ação desse receptor, sabe-se que tanto a sinalização para apoptose quanto para sobrevivência celular são ativadas ao mesmo tempo e a resposta celular é estabelecida pelo somatório de todos os sinais, originando uma atividade de acordo com o sinal que prevalecer (GAUR; AGGARWALL, 2003).

Por conseguinte, com base na ambiguidade da resposta celular frente ao estímulo desencadeado por TNFR1, o presente trabalho se encaixa em um eixo de pesquisas que buscam encontrar as respostas para essas dúvidas, que ainda permeiam o TNF- α . Elas são fundamentais para que terapias contra o câncer prostático sejam mais efetivas e, também, as propostas de prevenção consigam ser mais direcionadas. Além de poder melhorar o entendimento sobre a relação existente entre a carcinogênese e inflamações.

Indução da carcinogênese

Como é difícil realizar tais experimentos de carcinogênese em humanos, tanto por motivos éticos, como pelo fato de que, quando descoberto clinicamente, em sua

maioria, esse câncer já passou por um longo período de latência e a lesão maligna é resultante de um longo período de progressão, o que dificulta o estudo do seu desenvolvimento e progressão nos momentos iniciais (LEITZMANN; ROHRMANN, 2012; ABATE-SHEN; SHEN, 2002).

Em vista dessa dificuldade com amostras humanas, modelos de camundongos foram elaborados para os estudos do ambiente do câncer de próstata: xenográficos, geneticamente modificados (transgênicos) e os modelos *knockout* tradicionais e condicionais (VALKENBURG; WILLIAM, 2011).

A literatura descreve vários agentes para a indução de tumores com uso de agentes químicos, dentre eles destaca-se a o agente metilante: N-nitroso-N-metiluréia (MNU), seguido de tratamento com testosterona. O poder carcinogênico dessa combinação já foi relatado e mostrou-se muito eficaz em ratos e gerbilos, desenvolvendo tumores com muitas características comuns com os cânceres prostáticos humanos: metástase, perceptível mudança no grau de diferenciação histológica, aumento da fosfatase ácida sérica, longo período de latência e influência dos hormônios estrógenos (GONÇALVES et al., 2010). O uso de testosterona nesse modelo de indução justifica-se pelo fato de já ser bem estabelecido na literatura que uma ablação hormonal de andrógenos é um tratamento eficaz em vários casos para o câncer de próstata, em um primeiro momento. Esses estudos apontam para o fato de que, em seu início, a carcinogênese prostática tem uma dependência androgênica bem significativa (TAPLIN; BALK, 2004). Assim, a testosterona no protocolo teria o papel de potencializar a proliferação celular pós mutações gênicas causadas pelo MNU.

Embora esse protocolo de indução já seja sabidamente eficaz nesses modelos animais acima citados, em camundongo ainda não foi comprovado. Apenas um estudo cita esse tipo de indução de carcinogênese em camundongos e foi realizado por um período de indução de 7 meses (GONÇALVES et al., 2010; GONÇALVES et al., 2013; SHARMILA et al., 2014; PEIXOTO et al., 2015; TAYLOR et al., 2010). A importância de se testar a eficiência da indução da carcinogênese em camundongo se justifica pelo fato desse animal ser o único usado para o desenvolvimento de knockouts. Dessa forma, é de extrema relevância científica o uso de um modelo de indução de mais curto prazo como o proposto pelo trabalho e que possa ser usado com eficiência em camundongos.

2. OBJETIVOS

Geral

Esse trabalho foi uma frente de investigação de um grande projeto de estudo da carcinogênese prostática, do qual objetivou investigar um efeito protetor ou estimulador do TNF- α na carcinogênese da próstata de camundongos knockout para o receptor 1 do TNF- α .

Específicos

- Avaliar se os camundongos TNFR1^{-/-} apresentam maior ou menor incidência tumoral
- Determinar a frequência de proliferação celular na próstata desses animais após a carcinogênese
- Quantificar elementos estromais prostáticos relacionados à carcinogênese, tais como deposição de colágeno e fibronectina

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental e indução da carcinogênese

Foram utilizados camundongos C57Bl/6, sendo 24 selvagens e 26 *knockout* para TNFR1, machos adultos, com 60 dias de idade. Todos os animais utilizados no presente projeto foram mantidos no Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Uberlândia, em condições controladas de temperatura e luminosidade, com ração e água *ad libitum*. Os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU; processo nº 009/14).

A indução da carcinogênese química consistiu na administração de N-metil-N-nitrosouréia (MNU) seguida de estímulo androgênico por testosterona. Para isso, os animais selvagens (SMT; n=16) e *knockout* (KOT; n=20) foram mantidos em experimentação por 6 meses. Os grupos CT e KO receberam dose única intra-peritoneal do cancerígeno MNU (Sigma 40mg/Kg de peso do animal). A droga foi previamente 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) diluída em óleo mineral (veículo) (2mg/Kg de peso do animal) durante 6 meses como parte final do protocolo de indução de carcinogênese. Uma parte de animais selvagens (SM; n=8) e *knockout* (KO; n=6) foi considerada grupo controle e não passou pelo processo de carcinogênese, recebendo apenas o veículo semanalmente pelo período experimental. Depois do sacrifício, os animais foram pesados e em seguida foi realizada a retirada dos complexos prostáticos, que também foram pesados.

Análise morfológica

Os lobos prostáticos foram removidos e fixados por imersão em Metacarn (Metanol, Ácido Acético e Clorofórmio, 6:3:1). Após fixação por 3 horas, os fragmentos foram lavados em água, desidratados em etanol, clarificados em xilol e, então, incluídos em Paraplast. Os cortes foram feitos de forma seriada e tinham 4µm, utilizou-se micrótomo rotativo automático (Leica) e corados pelos seguintes métodos:

- *Coloração pela hematoxilina-eosina (HE)* – Para estudos morfológicos gerais da próstata;

▪ *Coloração pelo método do Picrosírius-hematoxilina* – Para estudo das fibras colágenas no estroma;

As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em fotomicroscópio Zeiss-Jenaval, acoplado em Sistema de aquisição e de Imagens.

As lesões benignas e malignas detectadas na próstata foram classificadas de acordo com o sistema proposto por Shappel *et al.* (2004) de classificação histopatológica para próstata de roedores, com teste cego por 3 avaliadores.

Análises imunohistoquímicas

Ensaio imunohistoquímico foram aplicados nas próstatas dos camundongos para detectar a presença e quantidade de células proliferativas (PCNA) e também aquelas para o elemento estromal fibronectina. Para isso, 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 H₂O₂ 3% em metanol por 20 minutos. A seguir, o bloqueio de interações protéicas inespecíficas foi realizado através de albumina bovina 4% em PBS e soro normal de cavalo. Assim, encubaram-se os cortes nos anticorpos primários por “overnight” a 4°C, segundo recomendação do fabricante. Após serem lavados em PBS os cortes passaram pela incubação com sistema de detecção polímero (Biocare) por 1 hora em temperatura ambiente. A revelação foi feita com diaminobenzidina- DAB, com tempo padronizado para cada anticorpo estudado e a contra-coloração em hematoxilina de Harris.

Quantificação dos elementos estromais

Foram determinadas as frações volumétricas das fibras estromais da próstata ventral tais como colágeno e também da glicoproteína fibronectina. Essa análise esterológica foi efetuada com base em cortes histológicos em parafina submetidos à coloração pelo Picrosírius-hematoxilina ou imunohistoquímica no caso da fibronectina, utilizando-se cortes histológicos de pelo menos dois fragmentos prostáticos diferentes por animal. De cada corte foram digitalizados mais de 20 campos microscópicos contíguos, no aumento de 40X e a porcentagem de cada componente tecidual em cada campo foi determinada usando a ferramenta limite de threshold do software Image J.

Análise estatística

Os dados numéricos de toda a investigação foram avaliados estatisticamente por teste ANOVA seguido de testes de múltiplas comparações entre grupos que foram escolhidos de acordo com a variação de cada parâmetro, com o uso do programa Statistica 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

4. RESULTADOS

Análises biométricas

A avaliação biométrica mostrou que, em relação ao peso prostático, no grupo selvagem (SM) não houve diferença expressiva entre os animais controles e os tratados com o carcinógeno. No grupo knockout (KO) essa diferença também não foi significativa e, o mesmo ocorreu para o peso corporal. Ademais, ao comparar os grupos selvagem e knockout, o primeiro apresentou menor peso prostático, porém maior peso corporal do que o segundo grupo, sendo essas diferenças entre os grupos significativas (Tabela 1).

Tabela 1 – Média do peso corporal e peso do complexo prostático de camundongos selvagens (SM) e TNFR1 knockout (KO) dos grupos controle e tratado para carcinogênese.

Grupo	Peso (g)	Controles	Carcinogênese
SM	Peso prostático	0,12±0,010	0,16±0,004*
	Peso corporal	34,1±0,7437	33,5±0,4749
KO	Peso prostático	0,12±0,009	0,17±0,006*
	Peso Corporal	28,2±1,636*	30,1±0,8051

Teste ANOVA seguido de teste de Tukey-Kramer com $p < 0,05$ indicando diferença significativa entre os grupos (*).

Análise histológica

A análise histológica foi realizada nos cortes seriados abrangendo todo o complexo da próstata, de acordo com a Figura 5. Esse complexo é constituído por: vesículas seminais (VS), lobos dorso-laterais (LDL), anterior (LA), ventral (LV), uretra (U) e os ductos ejaculatórios (DE). Embora todos os lobos foram analisados, as lesões se deram de forma mais expressiva na região dorsolateral, o que mostra a eficácia do modelo de indução, além das lesões ocorrerem no lobo que tem mais relação com os adenocarcinomas prostáticos de humanos. É observado que as porções dorso-laterais e ventrais apresentam diferenças. As primeiras mostram-se menos volumosas quando comparadas com as segundas e, ainda, têm epitélio mais basófilo e secreção mais espessa. A região ventral caracteriza-se por ter ácidos com o lúmen dilatado, poucas

pregas epiteliais e secreção mais fluida, esta singularidade a diferencia das porções laterais que são mais pregueadas e com lúmen acinar reduzido (Figura 5).

Os detalhes do lobo dorsolateral podem ser observados nas Figuras 6 e 7 respectivamente. Os animais knockout não exibem diferença histológica quando comparados aos seus pares selvagens (Figuras 6 A-D e 7A-D). Mesmo após tratamento com indutor da carcinogênese, com exceção das lesões benignas e malignas inerentes do tratamento, as regiões normais da glândula não apresentam alterações estruturais em nenhum dos grupos (Figuras 6 E-H e 7 E-H), exibindo o típico arranjo acinar com epitélio simples com áreas de maior pregueações, entremeadas com estroma de tecido conjuntivo frouxo, rico em vasos sanguíneos (Figuras 6 e 7).

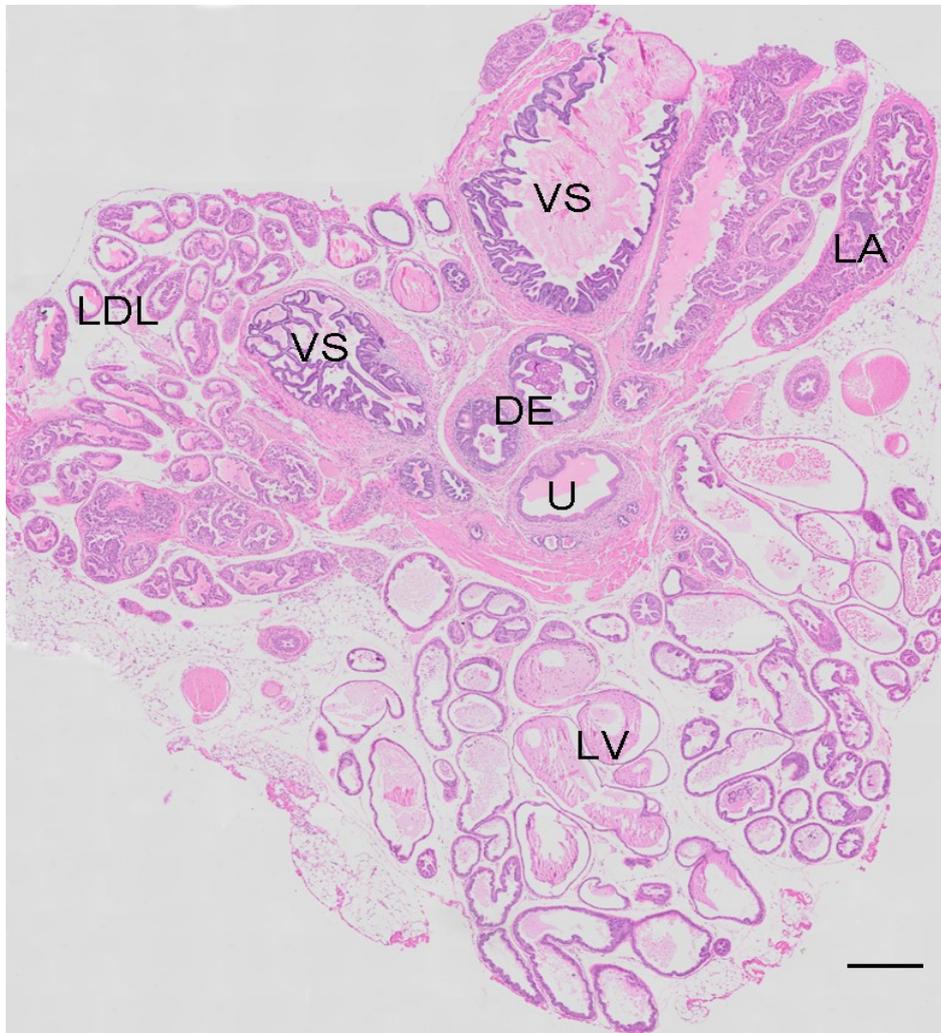


Figura 5 – Fotomicrografia de corte histológico da região mediana do complexo prostático de camundongo C57bl/6, mostrando os lobos típicos envolvendo a uretra. LDL – lobo dorso-lateral; VS – vesícula seminal; DE – ducto ejaculatório; U – uretra; LV – lobo ventral; LA – lobo anterior. Coloração: Hematoxilina-eosina. Análise em Scanner de lâminas histológicas com objetiva de 5X. Barra de escala: A - 10 μ m.

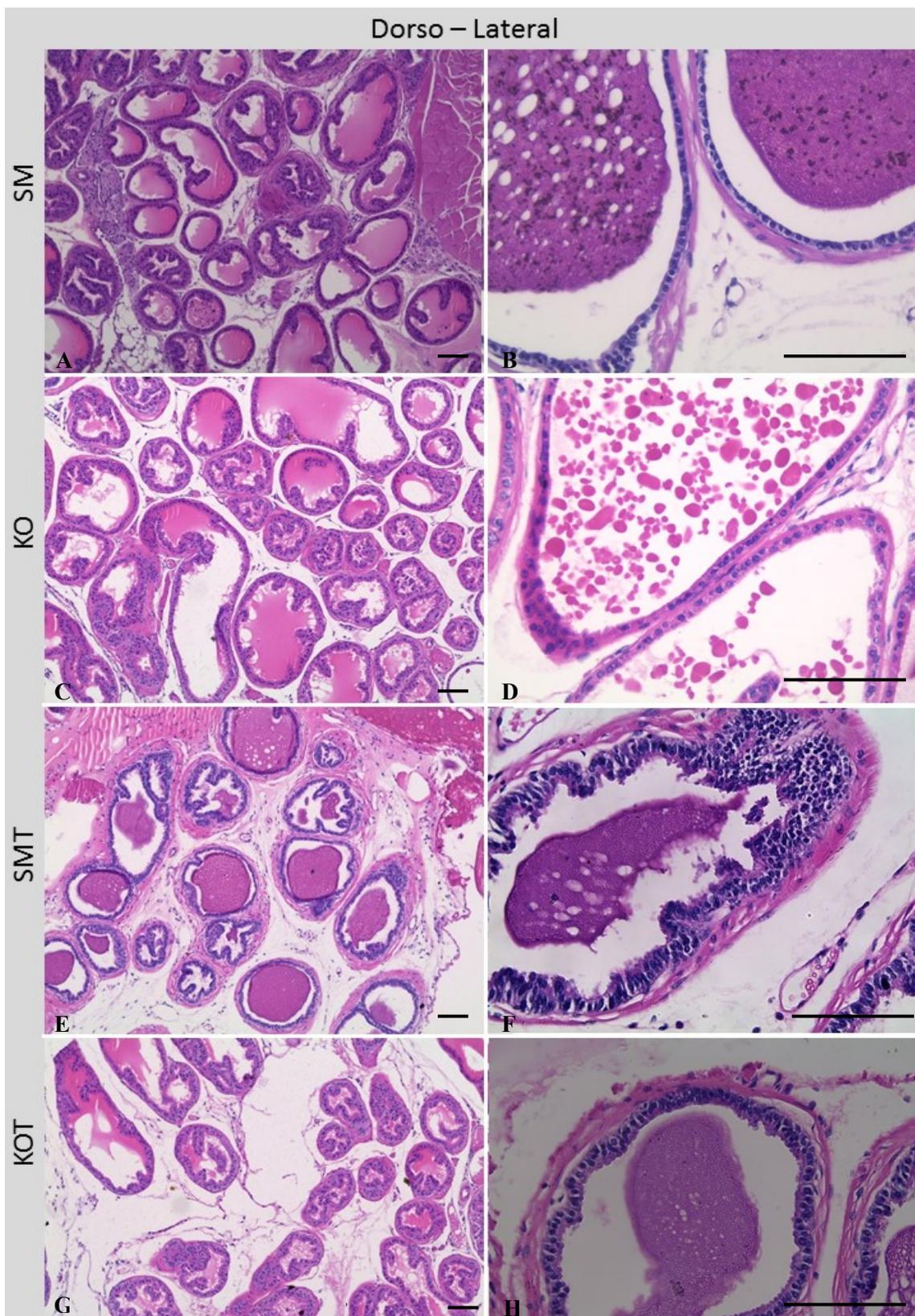


Figura 6 – Fotomicrografias da próstata dorso-lateral de camundongos selvagem (SM) e TNFR1-knockout (KO) dos grupos controles (SM e KO) e tratados com o carcinógeno (SMT e KOT). As imagens mostram as características histológicas gerais dessa porção da próstata, coradas em hematoxilina-eosina,

em aumentos de 10X e 40X. Barra de escala: A-50µm B-350µm; C-50µm; D-350µm; E-50µm; F-350µm; G-50µm; H-350µm.

Análises Histopatológicas

Em relação aos achados das análises histopatológicas, tanto os animais controles selvagens, quanto os TNFR1-knockout, não apresentaram lesões malignas. Já, entre os animais em que a carcinogênese foi induzida foram encontradas injúrias teciduais benignas, pré-malignas e malignas. As primeiras incluem hiperplasia e fibroadenoma, já as pré-malignas encontradas foram neoplasias intraepiteliais prostática (NIP) e, por fim, as malignas caracterizaram-se como adenocarcinomas. Os animais selvagens tratados com o agente cancerígeno manifestaram mais adenocarcinomas e maior incidência do que os knockout tratados (Tabela 2). Já em relação à NIP, os animais TNFR1-knockout apresentaram maiores valores tanto para incidência quanto para frequência em relação aos animais selvagens (Tabela 2).

Tabela 2 – Porcentagens de incidência e frequência dos vários tipos de lesões encontradas nos animais selvagens (SM) e TNFR1-knockout (KO) após a indução da carcinogênese (T).

Grupo	Tipo de lesão	Hiperplasia	Fibroadenoma	NIP	Adenocarcinoma
SMT	Incidência	61%	23%	69%	61%
	Frequência	30%	8%	16%	32%
KOT	Incidência	53%	20%	87%	20%*
	Frequência	23%	8%	57%*	14%

Teste de Fisher com $p < 0,05$ indicando diferença significativa entre os grupos (*).

Análise de proliferação celular

A Figura 7 representa a análise imunohistoquímica para PCNA da região dorsolateral da próstata. As fotomicrografias mostram uma notável redução de células em proliferação nos grupos TNFR1 KO em relação aos selvagens, com ou sem a indução da carcinogênese.

A contagem de células PCNA-positivas confirma as diferenças significativas notadas na análise histológica entre os grupos selvagem (SM) e TNFR1 knockout (KO). No grupo controle, a próstata dorso-lateral do grupo KO apresenta, aproximadamente,

quatro vezes menos células proliferativas do que os SM (Tabela 3). Mesmo após carcinogênese, esse padrão de redução de proliferação celular se repete nos animais KO, na próstata dorsolateral, onde a redução é ainda intensa. (Tabela 3).

Tabela 3 – Médias e desvio padrão das contagens de células PCNA-positivas e sua frequência relativa (% em relação ao total de células contadas) na região dorsolateral da próstata de camundongos selvagens (SM) e TNFR1-knockout (KO) controles e após carcinogênese química.

Dorso-lateral				
	Controles		Carcinogênese	
Grupo	SM	KO	SM	KO
Células positivas	0,83±1,37	0,344±0,73*	0,718±1,11	0,249±0,60*
Frequência	0,45±0,75	0,24±0,60*	0,437±0,72	0,148±0,40*

Teste de Mann-Whitney com $p < 0,05$ indicando diferença significativa entre os grupos (*).

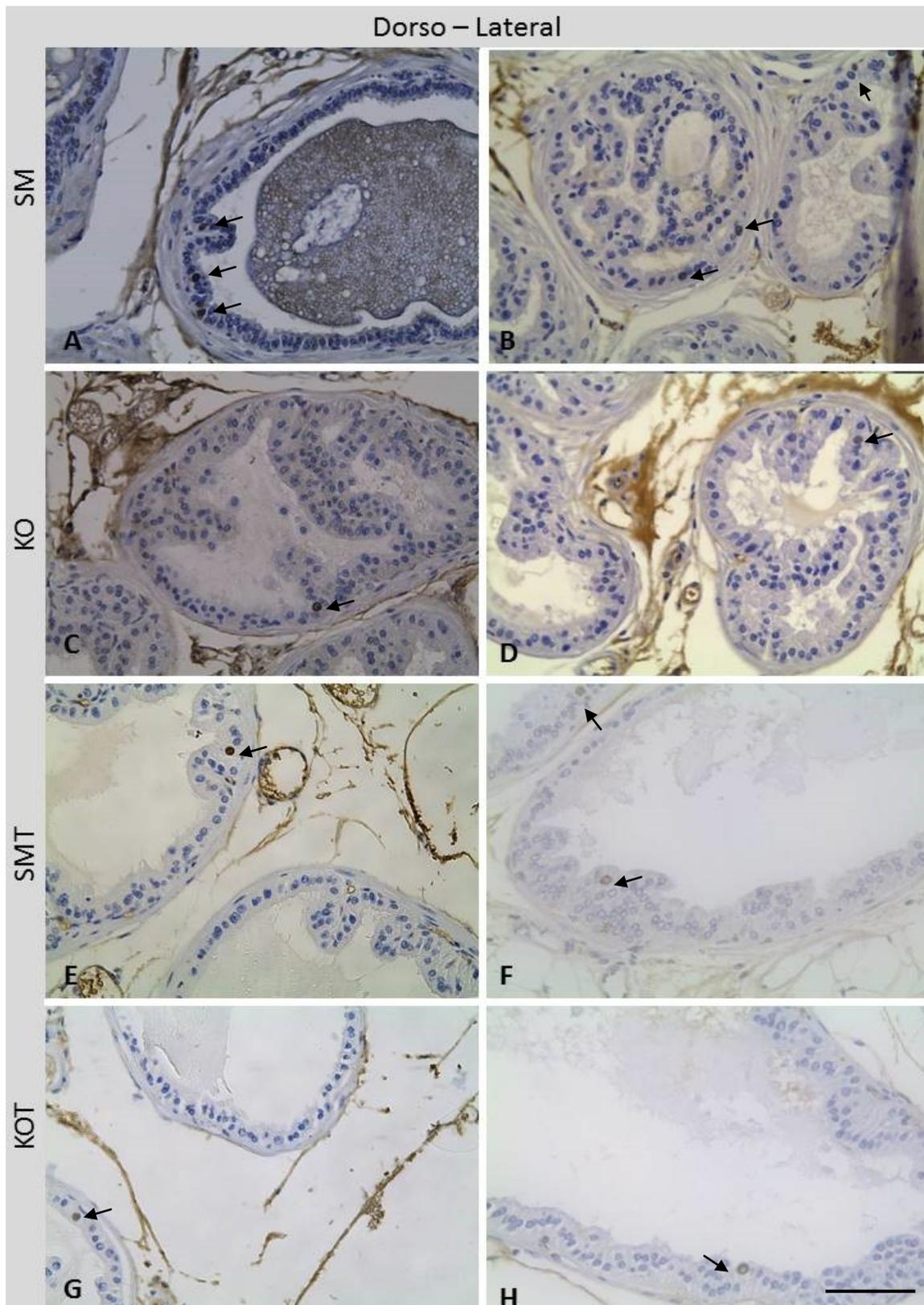


Figura 7 – Fotomicrografias de imunohistoquímica para PCNA na próstata dorsolateral do grupo selvagem (SM) e TNFR1-knockout (KO), controles (SM e KO) e tratados com o carcinógeno (SMT e KOT). As imagens mostram a presença de células proliferativas marcadas em marrom (setas) no epitélio acinar da próstata. Nota-se maior quantidade destas nos animais selvagens tanto no grupo controle (A - D) como no grupo da indução da carcinogênese (E - H). Barra de escala: 200 μ m.

Análise da distribuição de colágeno e fibronectina

A quantificação da distribuição de colágeno não sofreu modificação entre os grupos estudados, ou seja, não há diferença significativa entre os grupos (Figura 8).

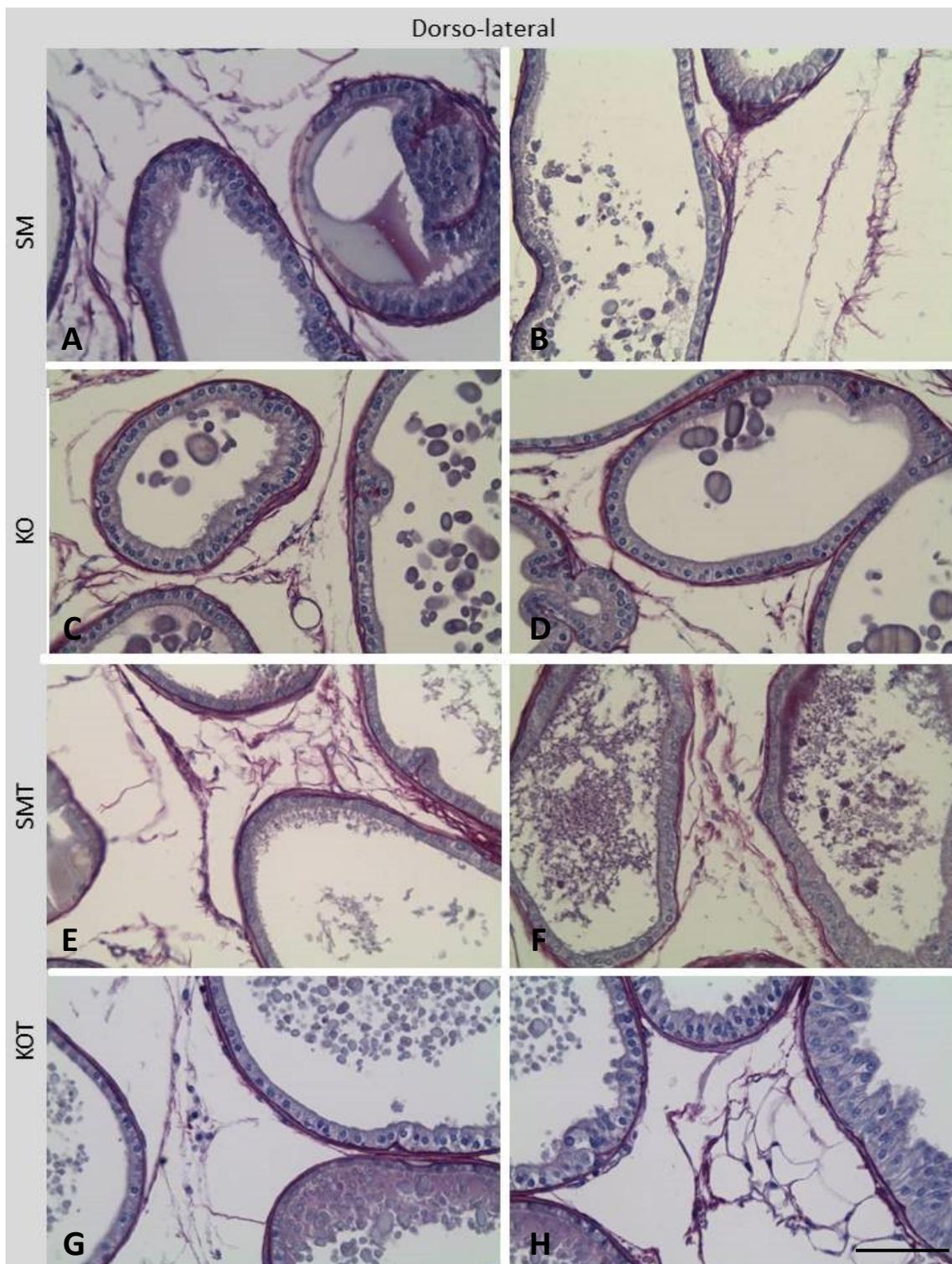


Figura 8 – Fotomicrografias da próstata dorsolateral do grupo selvagem (SM) e TNFR1-knockout (KO), controles (SM e KO) e tratados com o carcinógeno (SMT e KOT) coradas com Picrosúrio-Hematoxilina. A até H- As imagens mostram a presença de colágeno no estroma e ao redor de ácinos prostáticos, sem grandes diferenças entre os grupos. Barra de escala: 200µm

Já, em relação à fibronectina, observou-se que os animais knockout tratados com o agente carcinógeno apresentaram quantidade significativamente maior de fibronectina do que os animais selvagens também tratados, Os animais controles apresentaram também maior quantia de fibronectina nos knockout do que nos selvagens, entretanto esses dados não tiveram diferença significativa (Figura 9).

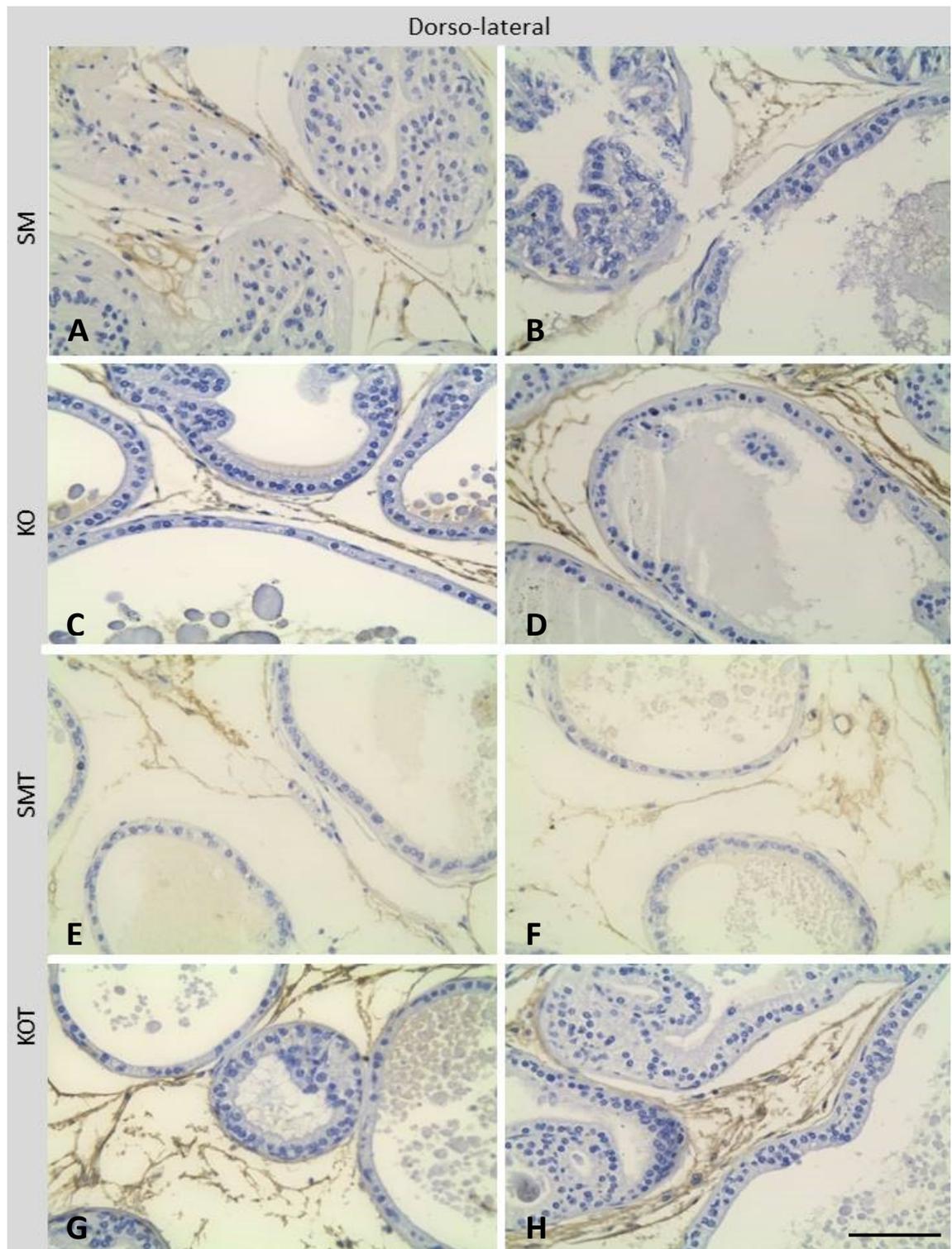


Figura 9 – Fotomicrografias de imunohistoquímica para fibronectina da próstata dorsolateral do grupo selvagem (SM) e TNFR1-knockout (KO), controles (SM e KO) e tratados com o carcinógeno (SMT e KOT). A até H- As imagens mostram a presença de fibronectina no estroma prostático. Nota-se maior quantidade destas nos animais TRFR1-knockout tanto no grupo controle (A - D) como no grupo da indução da carcinogênese (E - H). Barra de escala: 200 μ m.

5. DISCUSSÃO

Vários novos modelos animais de câncer de próstata estão sendo desenvolvidos com características peculiares que podem ser relevantes a aspectos específicos do processo carcinogênico ou a subtipos de câncer de próstata apresentando deficiências moleculares únicas ou propriedades biológicas particulares (LUCIA, 1998; BOSLAND, 1992; BOSLAND, 1999). O modelo de indução do câncer de próstata para roedores usado em nosso trabalho, pelo uso da droga N-methyl-N-Nitrosourea (NMU) associado à aplicação de testosterona, foi desenvolvido por Bosland (1992) e usado em vários estudos atuais como os de Silveira e outros (2015) e Peixoto e colaboradores (2015). Assim, como o que foi encontrado por Bosland (1992), em nosso trabalho esse modelo de indução também ocasionou tumores nas regiões dorsolateral e anterior da próstata, que são partes, normalmente consideradas homólogas à próstata de humanos e são mais susceptíveis ao câncer. Dessa forma, o uso desse modelo de indução foi pensado por sua relevância anatômica e fisiológica para avaliações e hipotetizações dos possíveis mecanismos envolvendo a carcinogênese prostática (MCCORMICK et al., 1998; MCCORMICK et al., 1999).

Ainda, sobre o modelo de indução, vale ressaltar que foi apropriado para o nosso estudo, pois foram desenvolvidas tanto lesões benignas como pré-malignas e malignas. As do tipo benignas encontradas foram: hiperplasia e fibroadenoma; as do tipo pré-malignas: neoplasia intraepitelial prostática e, por fim, as malignas como: adenocarcinoma. A hiperplasia é classificada por Shappel e outros (2004) como sendo tanto epitelial como estromal e estas áreas sofrem um aumento celular não neoplásico, mas geralmente a conformação das células é próxima das do epitélio normal. A neoplasia intraepitelial prostática (NIP) é determinada quando há uma proliferação atípica das células epiteliais e estas apresentam atipia nuclear (alargamento nuclear, irregularidade da membrana nuclear, hiper Cromasia, aglomeração da cromatina, nucléolos proeminentes ou uma mistura dessas transformações). Além disso, para ser caracterizado como NIP a lesão precisa ser focal e apresentar uma progressão tanto com aumento da extensão do envolvimento tecidual, quanto aumento das atipias nucleares, ou ambos. O adenocarcinoma, por sua vez, é uma neoplasia maligna invasiva, podendo ser bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pobremente diferenciado. Por fim, o fibroadenoma, segundo Kuijper e outros (2001), melhor relatado em câncer de

mama, é um tumor com componentes epitelial e estromal com algumas alterações teciduais.

Frente a isso, nota-se, em nosso estudo, um fator protetor nos animais TNFR1 knockout em relação à incidência e frequência de adenocarcinomas, o que sugere que a via do TNF- α , desencadeada por seu receptor tipo 1, pode ter relação com a progressão maligna do câncer prostático. Isso, porque em ambos os grupos estiveram presentes as injúrias benignas e pré-malignas, entretanto as malignas, apesar de também terem se desenvolvido nos dois grupos, ocorreram com incidência e frequência significativamente com menor nos camundongos TNFR1 knockout. Estudos recentes, em tipos celulares distintos tais como, hepatócitos, células mamárias, células linfáticas e renais, encontraram esse mesmo efeito do TNF- α observado em nossa investigação (Bigatto et al., 2015; Cao et al. 2015; Katanov et al., 2015; Mikami et al. 2015). Ademais, os achados de Popivanova e colaboradores (2008) confirmam que bloqueando o TNF- α ocorre uma diminuição da carcinogênese coloretal associada à inflamação. Michalak e colaboradores (2004) encontraram uma ligação positiva entre os níveis elevados de TNF- α no soro com câncer de próstata metastático. Esses dados da literatura, em associação com os nossos achados, apontam o papel promotor da via de sinalização do TNF- α no câncer.

Após a caracterização das lesões nos grupos que passaram pela indução da carcinogênese, os resultados de incidência de adenocarcinoma significativamente menor nos animais knockout nos chamou a atenção para uma investigação mais profunda dos mecanismos que pudessem proteger tais animais. Nesse sentido, a análise de célula em proliferação mostrou que a ocorrência de menor quantidade dessas células nos TNFR1-knockout do que os animais selvagens, tanto controles como nos que passaram pela carcinogênese. Dessa forma, esse resultado justificam nossos achados de que os animais TNFR1-knockout apresentam menos adenocarcinoma do que os selvagens, protegendo-os da carcinogênese. Já é bem descrito na literatura que o TNF- α tem papel na morte celular ativando caspases após ligação em TNFR1, como também pode estimular a proliferação e sobrevivência celular, através da ativação de NF- κ B como afirma Balkwill (2009). A preponderância de uma via sobre a outra varia nos diferentes tecidos, podendo estimular ou inibir os variados tipos de câncer. Dessa forma, nossos dados sugerem que no caso da próstata o TNF- α está relacionado às vias de proliferação e sobrevivência celular e mostra que seu efeito protetor em TNFR1 knockout muito provavelmente está relacionado com a via da proliferação e não com a da apoptose.

Trabalhos como o de Oshima e colaboradores (2014) encontraram esse mesmo efeito de redução, ou até mesmo supressão da proliferação, ao bloquear o gene do TNF- α .

O estroma prostático tem papel fundamental na manutenção da secreção e diferenciação da glândula, através da interação epitélio-mesenquimal, bem como nos processos de iniciação e progressão do câncer, através da sua remodelação (Cunha 2008). Desse modo, para nos aprofundarmos na busca dos elementos que pudessem proteger os animais knockouts do desenvolvimento de adenocarcinoma, além da proliferação celular, foram analisados também importantes moléculas estromais como a fibronectina e o colágeno na próstata. A primeira apresentou um aumento significativo nos TNFR1-knockout, enquanto o segundo não apresentou diferença notável entre os grupos. Barron e Rowley (2012) sugerem que a biologia da remodelação estromal é fundamental para promover diversas doenças que acometem a próstata, e todas elas têm, em comum, o que se chama de estroma reativo e inflamação. No câncer de próstata, a presença de células desdiferenciadas é uma característica comum no estroma reativo que acompanha as células tumorais e os eventos da carcinogênese (TUXHORN et al., 2002). Esse estroma reativo caracteriza-se pela presença de fibroblastos ativados e miofibroblastos responsáveis por secretar elementos da matriz que estimulam a invasão tumoral, tais como colágeno, fibronectina, tenascina, todos associados com grande expressão de metaloproteinases, que são moléculas que clivam os elementos estromais (LEIMGRUBER et al., 2011). Frente a isso, nossos resultados parecem caminhar para uma direção oposta a esse remodelamento, já que não parece ocorrer uma modificação estromal entre os grupos de animais em relação ao colágeno e fibronectina. Como os TNFR1-knockout tiveram menos lesões malignas era esperado uma menor quantidade desses componentes estromais nesse grupo, embasando a ideia de que essas moléculas são muito sinalizadoras para o câncer e que, portanto, deveriam estar em quantidades menores nos animais que apresentaram menos câncer. Entretanto, é preciso destacar que existem outros fatores importantes envolvidos no remodelamento da matriz celular, como as metaloproteinases. O fato da frequência dessas moléculas não ter mudado entre os grupos, mostra claramente que não há intensa atividade de metaloproteinase em quantidade suficiente para que ocorra a remodelação estromal. Isso indica um efeito protetor no grupo TNFR1-knockout, já que certos elementos da matriz, após a sua clivagem, liberam sinalização para proliferação, angiogênese e migração celular. Além disso, sugere-se que a via do TNF- α pode ter relações com alterações estromais, ainda

não elucidadas, que culminem para uma manutenção de um ambiente estromal que favorece o aparecimento de lesões benignas e pré-malignas.

6. CONCLUSÕES

A presente investigação mostrou que o modelo de indução com o MNU e testosterona foi eficiente, pois os animais tratados apresentaram diversos tipos de lesões benignas e malignas na próstata dorso-lateral. Ainda, fica evidente a relação positiva da via do TNF- α / TNFR1 na progressão maligna do câncer de próstata, uma vez que os camundongos TNFR1-knockout apresentaram menor incidência de adenocarcinoma. Tal proteção ao desenvolvimento de adenocarcinoma é decorrente da menor proliferação celular associado à ausência de remodelação estromal. Assim, na próstata, o TNF- α age na sua via desencadeada por TNFR1 através de mecanismos que ativam a proliferação e sobrevivência celular e não através da apoptose, estimulando o desenvolvimento maligno na próstata. Nesse sentido, estratégias de inibição dessa via de forma específica podem ser consideradas como ferramentas importantes para o tratamento do câncer de próstata.

7. REFERÊNCIAS

ABATE-SHEN, C.; SHEN, M. M. Mouse models of prostate carcinogenesis. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 05, 2002.

AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R. V.; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 2, p. 425-430, 2009.

ARMSTRONG, P. B.; ARMSTRONG, M. T. Intracellular invasions and the organizational stability of tissues a role for fibronectin. **Biotech et biophys Acta**, v. 1470, p. 90-20, 2000.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death Receptors: Signaling and Modulation. **Science**, v. 281, p. 1305-1308, Ago 1998.

AUMÜLLER, G. Morphologic and endocrine aspects of prostatic function. **The Prostate**, v. 4, p.195-214, 1983.

AUMÜLLER, G. SEITZ, J. Protein secretion and secretory process in male accessory sex glands. **Int. Rev. Cytol**, v. 121, p. 127-131, 1990.

BARRON, D. A.; ROWLEY, D. R. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. **Endocrine-related cancer**, v. 19, n. 6, p.R187-R204, 2012.

BLACK, R. A., RAUCH, C. T., KOZLOSKY, C. J., PESCHON, J. J., SLACK, J. L., WOLFSON, M. F., CASTNER, B. J.; STOCKING, K. L.; REDDY, P.; SKINIVASAN, S.; NELSON, N.; BOIANI, N.; SCHOOLEY, K. A.; GERHART, M.; DAVIS, R.; FITZNER, J. N.; JOHNSON, R. S.; PAXTON, R. J.; MARCH, C. J. CERRETTI, D. P. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour necrosis factor-R from cells. **Nature**, v. 385, n. 20, p. 729-733, 1997.

BRINKMAN, B. M. N.; HUIZINGA, T. W. J.; KURBAN, S. S.; VAN DER VELDE, E. A.; SCHREUDER, G. M. T.; HAZES, J. M. W.; BREEDVELD, F. C.; VERWEIJ, C. L. Tumour necrosis fator a gene polymorphisms in rheumatoid arthritis association with susceptibility to, or severity of disease? **British Journal of Rheumatology**, v. 36, p. 516-521, 1997.

BROWN, L. F., GUIDI, A. J., SCHNITT, S. J., VAN DE WATER, L., IRUELA-ARISPE, M. L., YEO, T. K., TOGNAZZI, K., and DVORAK, H. F. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. **Clin Cancer Res.**, v.5, p.1041–1056, 1999.

CHEN, G.; GOEDDEL, D. V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. **Science: Mapping Cellular Signaling**, v. 296, 2002.

CUNHA, G.R. Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future. **Differentiation**. v.76, n.6, p.578-86, 2008.

CUNHA G. R.; RICKE, W. A. A historical perspective on the role of stroma in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. **Differentiation**, v. 82, p. 168-172, 2011.

DE MARZO, A. M.; MEEKER, A. K.; ZHA, S.; LUO, J.; NAKAYAMA, M.; PLATZ, E. A.; ISAACS, W.B.; NELSON, W. G. Human prostate cancer precursors and pathobiology. **Urology**, v. 62 p.55–62, 2003.

DE MARZO, A. M.; PLATZ, E. A.; SUTCLIFFE, S.; XU, J.; GRONBERG, H.; DRAKE, C. G.; NAKAI, Y.; ISSACS, W. B.; NELSON, W. G. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 256–269, 2007.

DONG, J.T. Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 20, n. 3-4, p. 173-193, Dez 2001.

FEDERICO, A.; MORGILLO, F.; TUCCILLO, C.; CIARDIELLO, F.; LONGUERCIO, C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 11, p. 2381-2386, 2007

GAUR, U.; AGGARWAL, B. B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 8, 2003.

GOMES, R.; RABELLO, L. E. F. S.; ARAÚJO, F. C. D.; NASCIMENTO, E. F. D. A prevenção do câncer de próstata: uma revisão da literatura. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13, n. 1, p. 235-246, 2008.

GONÇALVES, B. F.; ZANETONI, C.; SCARANO, W. R.; GÓES, R. M.; VILAMAIOR, P. S.; TABOGA, S. R.; CAMPOS, S. G. 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. 1, p. 96-106, Fev. 2010.

GONÇALVES, B. F.; CAMPOS, S. G.; ZANETONI, C.; SCARANO, W. R.; FALLEIROS, F. L. Jr.; AMORIM, R. L.; GÓES, R. M.; TABOGA, S. R. 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.

GRIFFITHS K., DENIS L. J. Further insights into endocrine disease: regulation of prostatic growth. In: **The 4th International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia**. Paris;p.1-40, 1997.

HANAMURA, N., YOSHIDA, T., MATSUMOTO, E., KAWARADA, Y., and SAKAKURA, T. Expression of fibronectin and tenascin-C mRNA by myofibroblasts, vascular cells, and epithelial cells in human colon adenomas and carcinomas. **Int. J. Cancer**, v. 73, p. 10–15, 1997.

HAUPTMANN, S., ZARDI, L., SIRI, A., CARNEMOLLA, B., BORSI, L., CASTELLUCCI, M., KLOSTERHALFEN, B., HARTUNG, P., WEIS, J., STOCKER, G., et al. Extracellular matrix proteins in colorectal carcinomas. Expression of tenascin and fibronectin isoforms. **Lab Investig.**, n.73, p.172–182, 1995.

HOUGHTON, A. N.; UCHI, H. WOLCHOK, J. D. The role of the immune system in early epithelial carcinogenesis: B-ware the double-edged sword. **Cancer Cell**, v. 7, n. 5, p. 403-405, Maio 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.

Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>> Acesso em: 20 de novembro de 2017.

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

IWASAKI, S.; YOSHIZAWA, H.; AOYAGI, H. Localization of type III collagen in the lingual mucosa of rats during the morphogenesis of circumvallate papillae.

Odontology, v.100, p.10-21, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.

KAKKAD, S.M.; SOLAIYAPPAN, M.; ARGANI, P. et al. Collagen I fiber density increases in lymph node positive breast cancers: pilot study. **J. Biomed. Opt.**, v.17, p.1-7, 2012.

KOENING, A.; MUELLER, C.; HASEL, C. et al. Collagen type I induces disruption of e-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. **Cancer Res.**, v.66, p.4662-4671, 2006.

KIM, S. J.; KELLY, W. K.; FU, A.; HAINES, K.; HOFFMAN, A.; ZHENG, T.; ZHU, Y. Genome-wide methylation analysis identifies involvement of TNF- α mediated cancer pathways in prostate cancer. **Cancer Letters**, v. 302, n.1, p. 47-53, Mar 2011.

KOIVISTO, P., KONONEN, J., PALMBERG, C., TAMMELA, T., HYYTINEN, E., ISOLA, J.; TRAPMAN, J.; CLEUTJENS, K. NOORDZIJ, A.; VISAKORPI, T.; KALLIONIEMI, O. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. **Cancer Research**, v. 57, n. 2, p. 314-319, Jan 1997.

KOSMEHL, H.; BERNDT, A.; STRASBURGER, S.; BORSI, L.; ROUSSELLE, P.; MANDEL, U.; Distribution of laminin and fibronectin isoforms in oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**. v, 81. p, 1071-1079, 1999.

LAGACE, R., GRIMAUD, J. A., SCHURCH, W., and SEEMAYER, T. A. Myofibroblastic stromal reaction in carcinoma of the breast: variations of collagenous matrix and structural glycoproteins. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, v. 408, p.49-59, 1985.

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.

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

LI, A.; ZHOU, T.; GUO, L.; SI, J. Collagen type I regulates β -catenin tyrosine phosphorylation and nuclear translocation to promote migration and proliferation of gastric carcinoma cells. **Oncol. Rep.**, v.23, p.1247-1255, 2010.

LIN, W.; KARIN, M. Acytokine-mediated link between innate immunity, inflammation and cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1175-1183, Maio 2007.

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.

MACKIE, E. J., CHIQUET-EHRISMANN, R., PEARSON, C. A., INAGUMA, Y., TAYA, K., KAWARADA, Y., and SAKAKURA, T. Tenascin is a stromal marker for epithelial malignancy in the mammary gland. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.84, p.4621-4625, 1987.

McDERMOTT, M. F. TNF and TNFR biology in health and disease. **Cellular and Molecular Biology**, v. 47, n. 4, 2001.

McNEAL J. E. Origin and development of carcinoma in the prostate. **Cancer**, v.23, n. 1, p. 24-34, 1969.

McNEAL, J. E. Normal histology of the prostate. **The American Journal of surgical Pathology**, v. 12, n. 8, p. 619-633, ago. 1988.

McNEAL, J. E. The prostate and prostatic urethra: a morphologic synthesis. **J. Urol.**, v. 107, n. 6, p. 1008-1016, 1972.

McNEAL, J. E.; REESE, J. H.; REDWINE, E. A. FREIHA, F. S.; STAMEYA, T. A. Cribriform adenocarcinoma of the prostate. **Cancer**, v. 58, n. 8 p. 1714-1719, 1986

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

MOHRI, H. Fibronectin and integrins intercitons. **J Invest Med**. v, 44. p, 429-441, 1996.

NARAYANAN, K. N.; DOMINICK, N.; LORI, H.; BANDARU, S. R.; BOSLAND, M. C.; NARAYANAN, B. A. Inflammatory processes of prostate tissue microenvironment drive rat prostate carcinogenesis: preventive effects of celecoxib. **The Prostate**, v. 69, p. 133-141, 2009.

NELSON, W. G.; DE MARZO, A. M.; DEWEESE, T.L.; ISAACS, W. B. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. **Journal of Urology** v. 172 p.S6-S11, 2004.

- OSHIMA, H. et al. TNF- α /TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of Nox1 and Gna14 in tumor cells. **Oncogene**, v. 33, n. 29, p. 3820-3829, 2014.
- 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.
- PENNICA, D.; NEDWIN, G. E.; HAYFLICK, J. S.; SEEBURG, P. H.; DERYNCK, R.; PALLADINO, M. A.; KOHR, W. J.; AGGARWAL, B. B.; GOEDEL, D. V. Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. **Nature**, v. 312, p. 724-729, 1984.
- POPIVANOVA, Boryana K. et al. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 2, p. 560, 2008.
- REUTERS, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress inflammation and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, Dez 2010.
- RONNOV-JESSEN, L., PETERSEN, O. W., KOTELIANSKY, V. E.; BISSELL, M. J. The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. **J. Clin. Investig.**, 95: 859–873, 1995.
- RONNOV-JESSEN, L.; PETERSEN, O. W. Induction of α -smooth muscle actin by transforming growth factor 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. **Lab Investig.**, v. 68, p. 696–707, 1993.
- ROWLEY, D. R. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 2912-2923, Set 2002.
- ROWLEY, D. R. What might a stromal response mean to prostate cancer progression? **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 15, p. 411-419, 1999.
- SAPPINO, A. P.; SCHURCH, W.; GABBIANI, G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. **Lab Investig.**, v. 63, p.144–161, 1990.
- SCHAUER, I. G.; ROWLEY, D. R. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. **Differentiation**, v.82, p.200–210, 2011.
- SETHI, G.; SHANMUGAM, M. K.; RAMACHANDRAN, L.; KUMAR, A. P.; TERGAONKAR, V. Multifaceted link between cancer and inflammation. **Bioscience Reports**, v. 32, n. 1, p. 1-15, 2012.

SFANOS, K. S.; DE MARZO, A. M. Prostate cancer and inflammation: the evidence. **Histopathology**, v. 60, p. 199-215, 2012.

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.

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.

TAPLIN, M. E.; BALK, S. P. Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. **J.Cell. Biochem.**, v. 91, n. 3, p. 483-190, 2004.

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.

TOBOGA, S. R.; VILAMAIOR, P. S. L.; GOÉS, R. M. Modulação androgênica e estrogênica na próstata: uma abordagem em modelos experimentais de roedores com enfoque na biologia estrutural. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 53, n. 8, p. 946-955, 2009.

TUXHORN, J. A.; AYALA, G. E.; SMITH, M. J.; DANG, T. D.; ROWLEY, D.R. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. **Clin Cancer Res.**, v.8, p.2912-23, 2002.

TUXHORN, J. A.; AYALA, G. E.; ROWLEY, D. R. Reactive stroma in prostate cancer progression. **Journal of Urology** v. 166 p.2472–2483, 2001.

TUXHORN, J. A.; AYALA, G. E.; SMITH, M. J., SMITH, V. C.; DANG, T. D.; UPASNA, G.; AGGARWAL, B. B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1403-1408, 2003.

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

8. ANEXO

Esse trabalho foi parte das análises que deram origem ao artigo intitulado: “Role of the Tnf- α Receptor Type 1 on Prostate Carcinogenesis in Knockout Mice” publicado na revista *The Prostate*:

The Prostate 76:917-926 (2016)

Role of the Tnf- α Receptor Type I on Prostate Carcinogenesis in Knockout Mice

Maria Raquel Unterkircher Galheigo,¹ Amanda Rodrigues Cruz,¹ Ágata Silva Cabral,¹
Paulo Rogério Faria,¹ Renato Simões Cordeiro,¹ Marcelo José Barbosa Silva,²
Tatiana Carla Tomiosso,¹ Bianca Fachim Gonçalves,³ Maria Etelvina Pinto-Fochi,⁴
Sebastião Roberto Taboga,⁴ Rejane Maira Góes,⁴ and Daniele Lisboa Ribeiro^{1*}

¹*Histology Sector, Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brazil*

²*Immunology Sector, Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brazil*

³*Department of Morphology, Institute of Biosciences, Univ Estadual Paulista (IBB/UNESP), Botucatu, SP, Brazil*

⁴*Department of Biology, Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences, Univ Estadual Paulista (IBILCE/UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brazil*