



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LETÍCIA MONTANHOLI APOLINÁRIO

“EFEITOS DA IMUNOTERAPIA COM PMAPA ASSOCIADA À
TERAPIA ANTIANGIOGÊNICA NO TRATAMENTO DE LESÕES
PROSTÁTICAS QUIMICAMENTE INDUZIDAS EM RATOS”

CAMPINAS

2016.

LETÍCIA MONTANHOLI APOLINÁRIO

**“EFEITOS DA IMUNOTERAPIA COM PMAPA ASSOCIADA À
TERAPIA ANTIANGIOGÊNICA NO TRATAMENTO DE LESÕES
PROSTÁTICAS QUIMICAMENTE INDUZIDAS EM RATOS”**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de
Doutora em Biologia Celular e Estrutural, na área de
Anatomia.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA LETÍCIA
MONTANHOLI APOLINÁRIO E ORIENTADA PELO
PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO.

Orientador: PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO.

Co-orientador: PROF. DR. PATRICK VIANNA GARCIA.

CAMPINAS

2016.

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/01600-1; CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Ap43e Apolinário, Leticia Montanholi, 1988-
Efeitos da imunoterapia com PMAPA associada à terapia antiangiogênica no tratamento de lesões prostáticas quimicamente induzidas em ratos / Leticia Montanholi Apolinário. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Wagner José Fávaro.

Coorientador: Patrick Vianna Garcia.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Próstata - Câncer. 2. Imunoterapia. 3. P-Mapa. 4. Inibidores da angiogênese. 5. Remodelação vascular. I. Fávaro, Wagner José, 1980-. II. Garcia, Patrick Vianna, 1978-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of PMAPA immunotherapy associated with antiangiogenic therapy in the treatment of chemically induced prostatic lesions in rats

Palavras-chave em inglês:

Prostate - Cancer

Immunotherapy

P-Mapa

Angiogenesis inhibitors

Vascular remodeling

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Wagner José Fávaro [Orientador]

Carmen Silvia Passos de Lima

Valtencir Zucolotto

Luiz Gustavo de Almeida Chuffa

Leopoldo Alves Ribeiro Filho

Data de defesa: 15-12-2016

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 15 de Dezembro de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Wagner José Fávaro (Orientador)

Profa. Dra. Carmen Silvia Passos de Lima

Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa

Prof. Dr. Leopoldo Alves Ribeiro Filho

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

AOS AMORES DE MINHA VIDA

MEUS PAIS, NEUSA E JOÃO:

“Hoje, completo mais uma etapa e alcanço mais um de meus objetivos. A vocês devo as minhas conquistas até hoje. Mãe, obrigada por fazer de meus desejos, os seus sonhos; de minhas batalhas, sua guerra e de minhas realizações, a sua vitória. Obrigada por me ensinar a ter cautela e não, medo e por me dar asas para voar toda vez que mantém meus pés no chão. Obrigada por me ensinar a humildade, mas sempre lembrar que posso fazer ainda melhor e também por me lembrar de ser grata, sem esperar por gratidão. Pai, obrigada por me mostrar desde cedo que chorar não resolve e que se preocupar com o que não se pode resolver, é uma perda de tempo. Obrigada por desafiar-me a modificar as coisas que podem ser alteradas e encorajar-me a desbravar o mundo. Sou-lhes eternamente grata por abdicarem de si próprios e por não pouparem esforços para me oferecer o que não tiveram. Obrigada pela compreensão e por acreditarem que eu seria capaz!”

AOS MEUS AVÓS (*in memoriam*), “VÔ ÍPE E VÓ CIDA”:

“Para estar junto não é preciso estar perto e sim, do lado de dentro.”

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si e levam um pouco de nós”

Antoine de Saint-Exupéry

A Deus, por conceder-me saúde e resiliência para superar as adversidades e lutar por meus sonhos e por sempre colocar em meu caminho pessoas amigas, caridosas e preciosas.

Aos meus pais, **Neusa e João**, minha eterna gratidão pela paciência, amparo, compreensão, incentivo e pelo amor único e infinito; fraterno, amigo, confidente e que se oferece por inteiro.

Ao amigo e orientador **Prof. Dr. Wagner José Fávaro**, exemplo de dedicação, pela paciência, amizade e confiança, por todos os conhecimentos transmitidos desde quando o conheci como monitor de anatomia na graduação; pelas portas abertas, parcerias e oportunidades ímpares. *“Um homem esperto cria mais oportunidades do que encontra”*. Francis Bacon

Ao amigo **Iseu da Silva Nunes**, pelos conselhos, incentivo, confiança, ombro amigo e aprendizado que levarei para toda a vida. *“Fácil é ser colega, fazer companhia a alguém, dizer o que ele deseja ouvir. Difícil é ser amigo para todas as horas e dizer sempre a verdade quando for preciso. E com confiança no que diz.”* Carlos Drummond de Andrade

Ao amigo **Prof. Dr. Carlos Henrique Fioravanti**, por todo incentivo, credibilidade, amparo e contribuição para minha formação pessoal e profissional.

Ao amigo **Prof. Dr. Nelson Eduardo Duran Caballero**, educador excepcional e exemplo de dedicação, pela paciência, parceria, amizade e conhecimentos transmitidos.

Ao amigo **Prof. Dr. Patrick Vianna Garcia**, pela co-orientação, conhecimentos e colaboração durante a realização do meu estágio no exterior.

Ao amigo **João Carlos Cardoso Alonso**, exemplo de simplicidade, pelo apoio, parceria e troca de experiências.

Ao amigo **Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel**, mestre admirável durante toda a minha trajetória acadêmica, pela amizade, conhecimentos transmitidos e pelas considerações no exame de qualificação.

Ao **Prof. Dr. Murilo Vieira Geraldo** e a **Profa. Dra. Carmen Passos de Lima**, pelas valiosas considerações e sugestões no exame de qualificação.

Aos **Professores Doutores Margareth Warner e Jan-Ake Gustafsson**, por me aceitarem e acolherem fraternalmente durante o estágio em Houston e por todos os conhecimentos e experiências transmitidos.

Aos **Professores Doutores e Amigos Cintia Y. Matsumura, Renato Ferretti, Ana Paula T. Taniguti, Adriana Pertille e Wilson Romero Nakagaki** pelo acolhimento desde a iniciação científica e bons momentos compartilhados; pela troca de experiências, orientação acadêmica e companhia de todas as horas. Muito obrigada por todo o apoio, dedicação e principalmente pela paciência, imprescindíveis para minha formação pessoal e profissional. *“Eu aprendi que para se crescer como pessoa é preciso me cercar de gente mais inteligente do que eu.”*
William Shakespeare

À amiga **Dra. Samara Camaçari de Carvalho**, pelo carinho, auxílio, diversão e companheirismo diários e por compartilhar os desafios, aflições e as alegrias durante toda a pós-graduação. *“A dor dividida é tristeza subtraída, mas a felicidade compartilhada é alegria multiplicada!”*.

Aos amigos e técnicos do **ARCO Brasil CTE, Jener Sato, Camila Hasegawa, Pedro Augusto e André Curti**, por me acalmarem os nervos nos momentos decisivos, pelo carinho, amizade, pelos conselhos e momentos inesquecíveis compartilhados. Ser-lhes-ei eternamente grata por todo aprendizado, dentro e fora do esporte.

Aos brilhantes alunos de medicina **Alexandre Mota Mecê e Daniel de Almeida Rocha Valente**, por me darem a oportunidade de enfrentar os desafios da coorientação, ensinar e aprender com vocês, pela parceria e por todo auxílio durante a execução deste projeto.

À amiga **Liliam Alves Senne Panagio**, pela competência com que desenvolve seu trabalho e pela sua amizade, carinho, amparo e atenção dispensada durante toda a minha pós-graduação.

Aos colegas e companheiros de laboratório **Eduardo Rabelo Socca, Petra Karla Böckelmann, Marcela Duran, Joel Gonçalves de Sousa, Ana Claudia Lima, Miriam Matsumoto, Marco Aurélio de Aguiar e Silva, Keila Dias, Mariana dos Santos-, Mirian Muniz e Lara Paro** pelo apoio e aprendizagem diária ao longo do doutorado.

Aos amigos da Pós-Graduação, **Amanda Cia Hetzl, André Luis Bombeiro, Eduardo M. Cândido, Gustavo F. Simões, Leslie C. Pinto, Renata Zanon e Sheila C. Victorio** pela amizade, convivência e por transformarem o local de trabalho em um ambiente agradável e prazeroso.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural**, pelo incentivo à pesquisa e ao aprimoramento acadêmico de seus alunos.

Ao **Marco Aurélio Ribeiro de Paula** e ao **Norivaldo Celestino**, técnicos do laboratório, pela amizade, apoio e colaboração nos procedimentos experimentais deste trabalho.

Aos **Docentes** do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, **Maria Julia Marques, Humberto Santo-Neto, José Angelo Camilli, Elaine Minatel, Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira e Valéria Helena Alves Cagnon Quitete** pelo aprendizado compartilhado durante as disciplinas e pela colaboração para minha formação como educadora.

Aos **Funcionários** do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, por contribuírem, direta ou indiretamente, para a execução deste projeto.

Aos veteranos e amigos da Bio 05 diurno, **Fábio Montico, Janice, Sílvio Consonni, Raffaella Ignarro, Adilson, Karina, Larissa Rizzo e Carlos** pelo acolhimento nos primeiros anos da graduação e por compartilharem comigo as mesmas experiências, aflições e alegrias desde a entrada na universidade até o presente.

A todos os meus amigos e familiares, que mesmo de longe acompanharam toda a caminhada até a realização desta conquista.

À **CAPES/PROEX** e ao **CNPq**, pelo auxílio financeiro, e à **FAPESP**, pela concessão da bolsa de doutorado (2013/01600-1), os quais foram imprescindíveis para o desenvolvimento e finalização desta tese.

“Aprender é mudar posturas.” Platão

RESUMO

O baixo grau de eficácia das atuais terapias contra as lesões prostáticas proliferativas pode estar relacionado à modulação dos receptores de hormônios esteroides, aos mecanismos de reparo tecidual, à angiogênese e às espécies reativas de oxigênio. A natureza multifacetada do processo de angiogênese em neoplasias malignas sugere que a combinação de fármacos antiangiogênicos com agentes que modulem espécies pró e antioxidantes pode ser mais eficaz do que as terapias envolvendo um único agente. Neste cenário, destaca-se o PMAPA, um imunomodulador que abre uma nova perspectiva para o combate de alguns tipos de cânceres, incluindo o prostático. Neste trabalho, caracterizamos e comparamos os efeitos morfológicos e moleculares da terapia antiangiogênica com TNP470 associada ao imunomodulador PMAPA no tratamento de lesões prostáticas e buscamos estabelecer possíveis mecanismos de ação dessas terapias envolvendo fatores indutores e reparadores de lesão celular, receptores de hormônios sexuais esteroides, angiogênese e enzimas antioxidantes. Dos 25 ratos machos da linhagem Fischer 344 utilizados, 5 foram considerados controles e 20 receberam 15 mg/Kg de MNU na cápsula do lobo ventral prostático para indução das lesões prostáticas. Dos 20 animais, 5 receberam TNP470 (15mg/kg), subcutâneo, 3 vezes por semana durante 30 dias, 5 receberam PMAPA (5mg/kg) pela mesma via e período, 5 receberam TNP470 e PMAPA e outros 5 receberam salina. Após o tratamento, amostras do lobo ventral prostático de todos os animais foram coletadas, pesadas e normalizadas pelo peso corporal de cada animal e submetidas à análise histopatológica, à imunohistoquímica e ao Western Blotting. Nossos resultados demonstraram que nosso método de indução química de lesões prostáticas foi eficaz na promoção de lesões pré-malignas (PIN e PIA) e malignas (adenocarcinoma de graus baixo, intermediário e alto) em animais da linhagem Fischer 344, tornando-o um modelo adequado para ensaios de eficácia e toxicidade de novas perspectivas terapêuticas contra o câncer de próstata. Os fármacos PMAPA e TNP470 atuaram de modos diferentes em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas e interferiram nas vias de reparo tecidual, do estresse oxidativo e da angiogênese e também nos níveis dos receptores hormonais. O PMAPA demonstrou significativa atividade antitumoral contra o adenocarcinoma de grau intermediário e de alto grau e também foi eficaz contra a atrofia inflamatória proliferativa (PIA). A associação do PMAPA com o TNP470 foi a melhor abordagem terapêutica contra a PIN e contra a PIA, porém foi menos eficiente contra o adenocarcinoma prostático do que a terapia apenas com PMAPA.

Palavras-chave: carcinogênese prostática, imunoterapia, PMAPA, TNP470 e angiogênese.

ABSTRACT

The low level of effectiveness of current therapies against proliferative prostatic lesions may be related to the modulation of steroid hormone receptors, tissue repair mechanisms, angiogenesis and reactive oxygen species formation. The multifaceted process of angiogenesis in malignant tumors suggests that the combination of drugs with antiangiogenic agents modulating pro and antioxidants species is more effective than single agent therapies. In this scenario, we highlight PMAPA, an immunomodulator which opens a new perspective to fight some types of cancers, including prostate cancer (PC). In the present study, we characterized and compared the morphological and molecular effects of antiangiogenic therapy combined with PMAPA immunotherapy in the treatment of prostatic lesions and seek to establish possible mechanisms of action of these therapies involving molecular factors of cell injury, sex hormone steroid receptors, angiogenesis and antioxidant enzymes. 25 male rats Fischer 344 were used. For induction of prostatic lesions, 20 animals received daily subcutaneous dose of 100mg/kg of testosterone cypionate and were anesthetized for instillation of 15 mg/kg of MNU in the prostate capsule of the ventral lobe, one every 15 days, totaling 2 doses. After the last dose of MNU, animals received subcutaneous injections of 5 mg/kg of testosterone cypionate every other day for 120 days. Other 5 animals were considered control. After induction, the animals were divided into 5 groups: control group: received subcutaneous injections of 5 ml/kg of 0.9% saline solution three times a week for 30 days; MNU group received subcutaneous injections of 5 ml/kg of 0.9% saline solution three times a week for 30 days; MNU+TNP470 group: received subcutaneous injections of 15 mg/kg of TNP470 three times a week for 30 days; MNU+PMAPA group: received subcutaneous injections of 5 mg/kg of PMAPA three times a week for 30 days and MNU+TNP470+PMAPA group: both treated with TNP470 and PMAPA. After 150 days, samples of prostate ventral lobe of all animals were collected, weighed and normalized by body weight of each animal and submitted to histopathology, immunohistochemistry and Western Blotting. Our results demonstrated that our chemical induction method of prostatic lesions was effective in the promotion of premalignant (PIN and PIA) and malignant (adenocarcinoma) lesions in Fischer 344 strain, making it a suitable model for trials of efficacy and toxicity of new therapeutic perspectives against PC. PMAPA and TNP470's effects were different on premalignant and malignant lesions and affected steroid hormone receptors levels and tissue repair, oxidative stress and angiogenesis pathways. PMAPA demonstrated significant antitumor activity against intermediate grade and high-grade adenocarcinomas and was also effective against proliferative inflammatory atrophy (PIA). The association of PMAPA with TNP470 was the best therapeutic approach against PIN and PIA, but was less effective against prostate adenocarcinoma than PMAPA alone.

Keywords: prostate cancer, immunotherapy, PMAPA, TNP470 and angiogenesis.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAG:** adenocarcinoma de alto grau
- ABG:** adenocarcinoma de baixo grau
- AGI:** adenocarcinoma de grau intermediário
- Akt:** proteína cinase B (PKB)
- AP:** atrofia prostática
- APD:** atrofia prostática difusa
- APF:** atrofia prostática focal
- AR:** receptor de andrógeno
- ARE:** elemento de resposta antioxidante
- CAT:** catalase
- CBNMI:** câncer de bexiga não-músculo invasivo
- COX-2:** ciclo-oxigenase-2
- CP:** câncer prostático
- DHT:** dihidrotestosterona
- ER α :** receptor de estrógeno α
- ER β :** receptor de estrógeno β
- EO:** estresse oxidativo
- ERKs:** proteínas quinases reguladoras de sinalização extracelular
- EROs:** espécies reativas de oxigênio
- GR:** glutathione redutase
- GSH-Px1:** glutathione peroxidase 1
- GST:** glutathione-S-transferase
- HBP:** hiperplasia benigna da próstata
- HIF:** fator indutor de hipóxia
- HRE:** elementos responsivos à hipóxia
- ICAM:** moléculas de adesão intercelular
- IFN γ :** interferon-gama

IκB: inibidor de NFκB

IL: interleucina

IRF: fator regulador de interferon

JNKs: proteínas quinases c-jun-N-terminal

KEAP1: proteína 1 ECH associada Kelch-like

MAPKs: proteínas quinases ativadas por mitógeno

MEC: matriz extracelular

MetAP-2: metionina aminopeptidase-2

MMPs: metaloproteinases

NCoR: corepressor de receptor nuclear

NFκB: fator de transcrição nuclear κ B

NK: natural *killer*

NOX: NADPH oxidase

NRF2: fator de transcrição eritróide 2p45 relacionado ao fator 2

Pc: peso corporal

PHD: domínio prolil-hidroxilase

PIA: atrofia inflamatória proliferativa

PIN: neoplasia intraepitelial prostática

PI3K: fosfatidilinositol-bifosfato-3-cinase

Plv: peso do lobo ventral

PMAPA: agregado polimérico anídrico fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio

pVHL: proteínas supressora de tumor

Siah2: E3 ubiquitina-ligase de proteína Siah2

SOD: superóxido dismutase

TLR: receptores tipo *toll*

TNFα: fator de transcrição nuclear α

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

VEGFR: receptor de VEGF

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
1.1 Próstata: morfologia e fisiologia	15
1.2 Doenças prostáticas, radicais livre e enzimas antioxidantes	17
1.3 A via de sinalização dos receptores <i>toll-like</i> (TLR) e o câncer.....	21
1.4 Regulação da angiogênese.....	23
1.5 Alternativas terapêuticas contra o câncer de próstata.....	26
1.6 O modificador de resposta biológica: PMAPA.....	26
2. Justificativa e Objetivos	28
3. Materiais e métodos	30
3.1 Animais e procedimento experimental	30
3.2 Análise histopatológica.....	30
3.3 Imunohistoquímica.....	31
3.4 Extração de proteínas e Western Blotting.....	33
3.5 Análise estatística	34
4. Resultados.....	35
4.1 Razão entre o peso do lobo ventral e o peso corporal.....	35
4.2 Análise histopatológica.....	35
4.3 Imunohistoquímica.....	36
4.3.1 Fatores indutores e reparadores de lesão tecidual	36
4.3.2 Receptores hormonais.....	41
4.3.3 Enzimas antioxidantes e os radicais livres.....	45
4.3.4 Fatores reguladores da angiogênese.....	49
4.4 Western Blotting.....	54
4.4.1 Fatores indutores e reparadores de lesão tecidual.....	54
4.4.2 Receptores hormonais.....	54
4.4.3 Enzimas antioxidantes e os radicais livres.....	55
4.4.4 Fatores reguladores da angiogênese.....	56
5. Discussão.....	57
5.1 Método de indução e validação do modelo animal.....	57
5.2 Histopatologia.....	58
5.3 Efeitos do PMAPA e do TNP470 sobre os fatores indutores e reparadores de lesão tecidual	59
5.4 Efeitos do PMAPA e do TNP470 sobre os receptores hormonais.....	63
5.5 Efeitos do PMAPA e do TNP470 sobre as enzimas antioxidantes e os radicais livres.....	65
5.6 Efeitos do PMAPA e do TNP470 sobre os fatores reguladores da angiogênese.....	68
6. Conclusão.....	71
7. Referências bibliográficas.....	73
8. Anexos: tabelas, figuras, CEUA e declaração de direitos autorais.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1 Próstata: morfologia e fisiologia

A próstata é uma glândula acessória do sistema genital masculino que está presente nas diferentes ordens de mamíferos e é fundamental para o processo reprodutivo (Lin & Bissell, 1993; Bull et al., 2001; Marker et al., 2003; Untergasser et al., 2005). A secreção prostática é composta por ácido cítrico, ácido siálico, espermina, prostaglandinas, fosfatase ácida e alcalina, zinco e outros nutrientes que em conjunto, compõem o líquido seminal, fluido que neutraliza o meio e contribui para aumentar a motilidade e a fertilidade dos espermatozoides (Blandy & Lytton, 1986; Lin & Bissel, 1993).

Na espécie humana, a próstata se localiza ao redor da uretra e inferiormente à bexiga urinária e pode ser dividida em três regiões clinicamente importantes: zona periférica, zona central e zona pré-prostática, envoltas por uma fina camada fibromuscular (Setchell & Brooks, 1988). A próstata de roedores é composta por três pares de lobos: ventral, lateral e dorsal de acordo com seu posicionamento ao redor da uretra prostática e um par de glândulas coaguladoras ou próstata anterior, localizadas na face côncava das vesículas seminais (Sugimura et al., 1986; Aumüller & Seitz, 1990; Marker et al., 2003). Os lobos prostáticos são morfologicamente distintos e diferem também quanto ao produto secretado e a resposta hormonal (Costello & Franklin, 1994; Colombel & Buttyan, 1995). Embora não tenha homologia direta com a próstata humana, o lobo ventral é preferencialmente utilizado em estudos de carcinogênese prostática devido à sua dependência androgênica primária (Slayter et al., 1994). De modo geral, os lobos prostáticos são formados por estruturas túbulo-alveolares, com epitélio secretor simples envolto por componentes estromais (Niu & Xia, 2009). Entre o epitélio e o estroma, encontra-se a membrana basal, composta por laminina, colágeno tipo IV e pelo proteoglicano heparan sulfato (Knox et al., 1994; Jorcyk et al., 1998). O epitélio prostático é constituído por duas camadas de células, basal e luminal, nas quais se identificam três tipos celulares: células luminiais ou secretoras, basais e neuroendócrinas; distintas pela expressão de citoqueratinas e antígenos de superfície (Berry et al., 2008; Miki, 2009). O estroma prostático é constituído por fibroblastos, células musculares lisas e matriz extracelular, associados a fatores de crescimento ativos e latentes, moléculas reguladoras e enzimas de remodelação (Tuxhorn et al., 2001). A matriz extracelular (MEC) é uma rede de proteoglicanos, glicoproteínas adesivas e proteínas fibrilares, como colágeno e fibras elásticas, que proporcionam rigidez e flexibilidade ao tecido (Lin & Bissell, 1993; Kreis & Vale, 1999; Tuxhorn et al., 2001). Os proteoglicanos, por sua vez, controlam a estrutura e

permeabilidade da MEC, ligando-se a fatores de crescimento, proteases e inibidores de proteases e modulando a atividade destes (Taipale & Keski-Oja, 1997; Kreis & Vale, 1999; Tuxhorn et al., 2001). Ainda, terminações nervosas, células imunes e vasos sanguíneos também constituem partes integrais do estroma prostático (Tuxhorn et al., 2001). Assim, a associação das células estromais e da MEC propiciam um microambiente que regula o crescimento e a diferenciação das células adjacentes, mantendo a forma e a função do tecido (Tuxhorn et al., 2001; Cornell et al., 2003).

Os andrógenos regulam a morfogênese, a proliferação, a diferenciação e a manutenção da funcionalidade das células prostáticas (Leav et al., 2001; Cunha et al., 2002; Imamov et al., 2005). Os efeitos biológicos dos andrógenos ocorrem através da interação com os receptores androgênicos (AR) intracelulares, o complexo receptor-hormônio é translocado para o núcleo, onde regulará a expressão de genes específicos (Prins et al., 1991). A testosterona e a dihidrotestosterona (DHT) são os principais andrógenos responsáveis pela diferenciação prostática (Hsing, 2002, Toorians et al., 2003). A testosterona é convertida em DHT pela enzima 5 α -redutase, que possui duas formas (I e II), sendo que a tipo II predomina nos órgãos genitais masculinos, incluindo a próstata (Prins et al., 1991; Toorians et al., 2003). Além disso, estudos recentes suportam a hipótese de que as vias de sinalização do AR desempenham um papel importante no desenvolvimento e progressão de alguns cânceres, explicando algumas das diferenças entre os tumores masculinos e femininos (Hetge et al., 1990; Siegel et al., 2012; Li et al., 2012).

Além dos andrógenos, outros hormônios como os estrógenos atuam sinergicamente à testosterona, influenciando tanto as funções normais quanto as alterações patológicas na próstata de humanos e roedores (Weihua et al., 2001; Cunha et al., 2002). Os estrógenos possuem efeitos anti-androgênicos e regulam negativamente o eixo hipotálamo-hipófise-gonada, reduzindo a produção de andrógenos pelas células de Leydig, causando a involução do epitélio prostático e o crescimento estromal em animais adultos (Weihua et al., 2002). A biossíntese de estrógenos ocorre a partir de um substrato androgênico, através da aromatização desse hormônio pela enzima aromatase (O'Donnell et al., 2001; Risbridger et al., 2007). Os efeitos estrogênicos na próstata são resultados da ligação desses hormônios com receptores estrogênicos específicos α e β (ER α , ER β), predominantemente expressos no estroma e no epitélio, respectivamente (Risbridger et al., 2001; Cunha et al., 2002).

Diversos experimentos demonstraram que os efeitos estrogênicos na próstata são produtos de um balanço dinâmico entre ER α e ER β (Weihua et al., 2002). Além disso, esses efeitos podem envolver ações diretas, através dos receptores, como indiretas, através do eixo

hipotálamo-hipófise-gonada (Cunah et al., 2002). Weihua e colaboradores (2002) avaliaram camundongos *knockouts* para ER β e encontraram focos de hiperplasia epitelial celular no lobo ventral da próstata aos 5 meses de idade e o neoplasias aos 12 meses, afirmando a capacidade antiproliferativa dos ER β . Outro estudo destacou que o ER β pode estar envolvido não só em um processo antiproliferativo epitelial, mas também no aumento do processo apoptótico epitelial glandular (Imamov et al., 2004). Esta afirmação baseou-se no fato de camundongos *Knockout* para os ER β apresentarem aumento da proliferação epitelial e decréscimo da apoptose (Imamov et al., 2004). Segundo Adams et al. (2002), os ER β s em conjunto com os hormônios androgênicos podem mediar diversos efeitos sobre a proliferação epitelial prostática, promovendo a proliferação celular em períodos iniciais gestacionais e agindo de forma a limitar o crescimento celular em períodos tardios da gestação de fetos humanos. Ainda, diversos estudos demonstraram que o ER β é suprarregulado por andrógenos (Singh et al., 2008).

1.2 Doenças prostáticas, radicais livres e enzimas antioxidantes.

A morfologia e a fisiologia da próstata têm sido examinadas com particular atenção às doenças que atingem esse órgão. Dentre elas, destacam-se a hiperplasia benigna prostática (HBP), o câncer prostático (CP), a neoplasia intraepitelial (PIN), a atrofia prostática (AP) e a atrofia inflamatória proliferativa (PIA) (Leav et al., 2001; De Marzo et al., 2003).

A HBP está associada ao envelhecimento, caracterizando-se por predominante proliferação estromal e, embora ocorra o aumento substancial do epitélio, a integridade regional da glândula é mantida (Droller, 1997; Krieg et al., 1993).

De acordo com Majumder et al. (2008), a PIN é clinicamente apontada como uma lesão precursora do adenocarcinoma invasivo e pode precedê-lo por até 10 anos, mas os mecanismos moleculares que suportam essa transição ainda não são conhecidos. Estudos clínicos demonstraram que homens com PIN de alto grau possuem 17% a 35% de risco de desenvolver o CP. O CP é a segunda maior causa de mortes por câncer na população ocidental masculina. O CP é considerado uma doença epitelial e, frequentemente, estende-se além dos limites normais do órgão (Droller, 1997; Wong et al., 2000). O desenvolvimento do CP é de natureza endócrina e a possibilidade de ocorrência desta doença aumenta com o envelhecimento (Davies & Eaton, 1991).

A AP também tem sido considerada uma alteração prostática precursora do adenocarcinoma e associada a um quadro de inflamação crônica (De Marzo et al., 2003). Em homens senis, áreas de atrofia epitelial são extremamente comuns na próstata (De Marzo et

al., 2007). A AP é caracterizada pela redução do volume de glândulas preexistentes e pode ser dividida em dois tipos: difusa (APD) e focal (APF) (De Marzo et al., 2003). APD resulta da diminuição dos andrógenos circulantes e compromete a próstata de forma relativamente uniforme. Em contraste, a APF pode não estar relacionada à diminuição das concentrações de andrógenos circulantes e compromete apenas parte da glândula (De Marzo et al., 2003).

A PIA é a lesão do epitélio prostático que ocorre simultaneamente aos diferentes graus de inflamação intersticial adjacente. O termo PIA foi proposto por De Marzo et al. (1999) para designar focos de epitélio glandular proliferativo com o aspecto morfológico de atrofia simples ou de hiperplasia pós-atrófica, ocorrendo em associação à inflamação. Os mesmos autores demonstraram que apesar da proliferação, a lesão não cresce em volume devido a possível perda celular que compensa a proliferação. Além disso, esses autores acreditam que o epitélio em regeneração possa suprir a morte celular programada, ao menos temporariamente, para substituir as células “perdidas”, o que embasa o conceito de que a PIA é uma lesão regenerativa. Ainda, Putzi & De Marzo (2000) postularam que a PIA possa representar uma condição precursora da PIN e/ou do CP. Segundo De Marzo et al. (2003), todas as formas de atrofia focal da próstata são proliferativas e a maioria delas está associada à inflamação, de maneira que essas lesões podem se originar em um cenário de estresse oxidativo aumentado, possivelmente, derivado das células inflamatórias adjacentes.

A incidência de doenças relacionadas aos processos cancerígenos no organismo envolvendo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) vem merecendo especial atenção nos últimos anos (Ichimura et al., 2004; Khandrika et al., 2009; Bayraktar et al., 2010). EROs são moléculas altamente instáveis e reativas que possuem um elétron não-pareado no orbital mais externo (Elsbach & Weiss, 1983; Khandrika et al., 2009). Essa configuração eletroquímica permite a interação com macromoléculas biológicas, podendo causar alterações nos componentes celulares: proteína, DNA e lipídio (Brown-Borg et al., 1999). Dentre as espécies radicalares causadoras de danos à célula tem-se: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH\cdot$) (Khandrika et al., 2009).

EROs são consideradas carcinógenos efetivos e que podem participar da iniciação, progressão e metástase das neoplasias (Eblin et al., 2008). As EROs geradas no ambiente intracelular podem produzir alterações em uma fita ou na dupla fita de DNA, oxidando as bases pirimídicas, púricas e desoxirriboses, levando à mutagênese (Bayraktar et al., 2010). A modificação em alguns genes pode ativar pró-oncogenes ou desativar genes supressores de tumor (Shi et al., 2004; Wang et al., 2007; Badjatia et al., 2010). Além disso, grandes

quantidades de H₂O₂ são produzidas e excretadas pelas células tumorais, confirmando sua importância na propagação e invasão tumorais.

O desequilíbrio entre a formação e a remoção de EROs no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de EROs, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, podendo resultar na morte celular (Badjatia et al., 2010; Bayraktar et al., 2010). Assim, instala-se o estresse oxidativo (EO), condição na qual ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidantes (Brown-Borg et al., 1999; Badjatia et al., 2010; Bayraktar et al., 2010). O EO persistente em níveis subletais pode causar resistência a apoptose, além de promover a proliferação celular *in vitro*, com o crescimento estimulado por superóxido e peróxido de hidrogênio (Brown & Bicknell 2001).

Os andrógenos são considerados os candidatos mais potentes na regulação do balanço de EROs na próstata, embora a relação entre o nível androgênico e a homeostase redox ainda não esteja caracterizada nessa glândula (Khandrika et al., 2009). Andrógenos em câncer de próstata aumentam a expressão das subunidades p22 e gp91 do NOX e a produção de EROS liberados por NOX1 e NOX2 (Lu et al., 2010). Contudo, Tam et al. (2003) demonstraram que a suplementação de andrógenos reduziu o nível de EROs por infra-regulação da expressão de NOX, elevando assim o nível de antioxidantes à normalidade.

Nas células tumorais, as EROs estimulam a produção de fatores angiogênicos, como a interleucina 8 (IL8) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), a secreção de metaloproteinase da matriz 2 (MMP2), uma gelatinase que auxilia o crescimento de vasos sanguíneos no interior do microambiente tumoral (Brown & Bicknell, 2001) e também podem aumentar a migração de células tumorais, com consequente aumento do risco de invasão e metástase (Brown & Bicknell, 2001; Ushio-Fukai & Nakamura, 2008; Khandrika et al., 2009; Badjatia et al., 2010).

Nos últimos anos, a associação entre o risco de CP e o EO tem sido reconhecida. Embora estudos recentes tenham indicado que o EO é maior no epitélio de pacientes com CP do que em homens sem a doença, a associação do EO mediado por EROs e o risco de CP ainda necessita de maiores investigações. Na literatura especializada, existem diferentes hipóteses acerca do papel do EO no desenvolvimento do CP, tais como: insuficiência do mecanismo de defesa antioxidante (devido ao EO persistente que leva a defeitos no sistema imune inato e adquirido), mutações mitocondriais, inflamação crônica, mecanismos de reparo do DNA e apoptose defeituosos (Fleshner & Klotz, 1999). Assim, muitos dos fatores que estão associados ao CP, como o desbalanço dos hormônios androgênicos e estrogênicos,

insuficiência do sistema antioxidante e condições pré-malignas (PIN, PIA, HBP) podem estar relacionados ao EO (Partin et al., 1993; Sakr et al., 1993; Bostwick et al., 2000).

O organismo humano possui um sistema de defesa intrínseco contra a ação de EROs. Esse sistema pode ser subdividido em sistemas enzimáticos e não-enzimáticos. Vitaminas A, C, E e selênio estão entre os principais antioxidantes não-enzimáticos do organismo (Ichimura et al., 2004; Badjatia et al., 2010; Bayraktar et al., 2010). Dentre as enzimas antioxidantes, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion superóxido em H_2O_2 ; a catalase (CAT), que converte H_2O_2 em oxigênio molecular e água; e a glutathione peroxidase (GSH-Px), que catalisa a degradação de H_2O_2 e hidroperóxidos e, dessa maneira compõe importantes vias detoxificadoras de EROs (Brown-Borg et al., 1999; Badjatia et al., 2010; Bayraktar et al., 2010). Enzimas outras, “secundárias”, como a glutathione-S-transferase (GST) e a glutathione redutase (GR) atuam conjuntamente com a GSH-Px na detoxificação de EROs (Badjatia et al., 2010; Bayraktar et al., 2010).

As alterações no balanço entre antioxidantes e EROs implicam em lesões de DNA gerando processos pré-mutagênicos e podendo levar, em alguns casos, ao câncer (Ichimura et al., 2004; Eblin et al., 2008; Badjatia et al., 2010; Bayraktar et al., 2010). Desta forma, a quantificação da glutathione pode indicar uma possível correlação entre a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e o aumento nos níveis de bases de DNA lesadas devido ao dano oxidativo (Ichimura et al., 2004; Eblin et al., 2008; Badjatia et al., 2010; Bayraktar et al., 2010).

Apesar da relevância clínica das enzimas antioxidantes, na literatura especializada são escassos os dados sobre os perfis de expressão e regulação dessas enzimas no CP. Battisti et al. (2011) correlacionaram o grau Gleason e o estágio do CP com as atividades das enzimas SOD, CAT e GSH-Px e concluíram que a diminuição dos níveis séricos destas enzimas antioxidantes é considerado um importante fator de desenvolvimento e progressão tumoral. Polimorfismos no gene da enzima GST foram associados ao aumento do risco de desenvolvimento do CP (Qadri et al., 2011). A superfamília da enzima GST está envolvida na biotransformação de vários compostos reconhecidos como fatores de risco para o CP e o carcinoma urotelial, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e solventes halogenados, catalisando a conjugação desses compostos eletrofílicos em glutathione, o que diminui suas toxicidades e facilita suas excreções pelo organismo (Matic et al., 2010; Battisti et al., 2011; Qadri et al., 2011). Contudo, nas células tumorais, a ação das GSTs pode levar à resistência de drogas antitumorais (Townsend & Tew, 2003). A GSTP, uma subclasse da enzima GST, também está envolvida na detoxificação de carcinógenos e atividade

antioxidante (Qadri et al., 2011). Nelson et al. (2007) e Qadri et al. (2011) demonstraram que mutações somáticas causam inativação do gene para GSTP, localizado no cromossomo 11q13, aumentando o risco para CP.

Além dos andrógenos e estrógenos, o fator de transcrição eritróide 2p45 (NF-E2), relacionado ao fator 2 (NRF2) medeia a expressão de enzimas de proteção através do elemento de resposta antioxidante (ARE) no CP (Goswami et al., 2007; Yilmaz et al., 2004). Estudos recentes demonstraram que o NRF2 e vários dos seus genes alvo foram significativamente infra-regulados no CP e como resultado, as células prostáticas foram expostas continuamente ao EO, com consequente progressão para a doença metastática (Baker et al., 1997; Khandrika et al., 2009).

1.3 Via de sinalização dos receptores *Toll-like* (TLR) e o Câncer.

Os receptores TLR compreendem uma família de receptores transmembrana que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos e têm papel fundamental na reparação tecidual e lesão tecidual induzida por inflamação (Kumar et al. 2011; Galli et al. 2010). Os TLRs que reconhecem lipídios e proteínas ligantes (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) estão expressos na membrana plasmática, enquanto os TLRs que detectam ácidos nucleicos virais (TLR3, TLR7 e TLR9) estão localizados em compartimentos lisossomais (Takeda et al., 2003; Akira & Takeda, 2004; Galli et al., 2010). A transdução de sinais dos TLRs ocorre através de diferentes proteínas adaptadoras que desencadeiam uma cascata de sinalização envolvendo o fator de transcrição nuclear κ B (NF κ B), proteínas-quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), p38, proteínas quinases c-jun-N-terminal (JNKs), proteínas quinases reguladoras de sinalização extracelular (ERKs) e os fatores reguladores de interferon (IRF3, IRF5 e IRF7) (Akira & Takeda, 2004). Muitos dos efeitos conhecidos da sinalização dos TLRs ocorrem através da translocação do NF κ B e subsequente produção de moléculas inflamatórias e moléculas para sobrevivência celular, como TNF α e interleucinas 1 e 6 (IL1 e IL6) (Akira & Takeda, 2004; Galli et al., 2010). A função clássica dos TLRs consiste no recrutamento de leucócitos para os tecidos infectados com posterior indução de respostas imunes adaptativas (Akira & Takeda, 2004; Galli et al., 2010). A ativação dos TLRs na superfície das células epiteliais induz a expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM) que desempenham papel fundamental na implantação e adesão de leucócitos (Galli et al., 2010).

Os TLRs foram, inicialmente, identificados somente em células imunes e epiteliais, contudo estudos recentes demonstraram que estes receptores também são expressos em

algumas células tumorais, sendo que essa expressão está relacionada à carcinogênese (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2009; Galli et al., 2010). O papel dos TLRs no câncer é uma questão controversa, pois dados conflitantes apontam os TLRs como reguladores negativos e positivos da carcinogênese. A administração de agonistas dos TLRs exerceu fortes efeitos antineoplásicos contra tumores desenvolvidos em camundongos e humanos (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2009). A ativação dos TLRs pode causar a regressão do tumor através do aumento da permeabilidade vascular e por meio do recrutamento de leucócitos, os quais determinam a lise das células tumorais pelas células natural killer (NK) e células T citotóxicas (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2009). Assim, um dos efeitos mais promissores da estimulação dos TLRs por agonistas específicos na terapia do câncer é a ativação do sistema imune adaptativo (Krieg, 2007; Paone et al., 2008; Galli et al., 2010).

Dependendo da intensidade e da natureza da resposta, a inflamação pode tanto promover a carcinogênese, como exercer efeitos antitumorais (Mantovani et al., 2008; Galli et al., 2010). Na maioria dos casos, a inflamação associada ao câncer é semelhante à inflamação crônica, incluindo a produção de fatores que estimulam o reparo tecidual, a proliferação e a sobrevivência da célula cancerosa (Mantovani et al., 2008; Galli et al., 2010). No entanto, se a resposta inflamatória se desenvolve em inflamação aguda, um mecanismo efetor imunológico é ativado com consequente regressão do tumor (Mantovani et al., 2008; Galli et al., 2010). Considerando os diversos elementos que controlam os processos neoplásicos, um importante papel é atribuído aos membros da superfamília das quimiocinas (Ben-Baruch, 2006). Quimiocinas expressas pelas células tumorais e células do hospedeiro desempenham um papel crítico no desenvolvimento do tumor através da regulação da migração de diferentes subtipos de leucócitos (Ben-Baruch, 2006). A proporção relativa de cada tipo de célula de defesa no interior do tumor, por exemplo, macrófagos, células T, células NK e células dendríticas determina em grande parte o perfil imunológico local (Allavena et al., 2008). Células T CD8 e alguns tipos de células do sistema imunológico inato, como as células NK, podem inibir o crescimento tumoral (Allavena et al., 2008; Mantovani et al., 2008; Galli et al., 2010).

Em contraste, a estimulação de alguns TLRs aumenta a proliferação e a sobrevivência tumoral, sugerindo que a estimulação dos TLRs favorece a carcinogênese (Jego et al., 2006). Recentemente, a expressão aberrante do TLR4 foi encontrada na maioria dos carcinomas humanos, inclusive o CP (Huang et al., 2005; Dong et al., 2002; Brown et al., 2003; Hua et al., 2009; Riddell et al., 2011). Estudos têm demonstrado que a expressão aumentada do TLR3, TLR4 e TLR9 correlaciona-se com a progressão do CP (González-Reyes et al., 2011).

A via de sinalização do NFκB desempenha um papel importante nas respostas ao câncer, inflamação e estresse (Pahl, 1999; Meng et al., 2010). NFκB é um fator de transcrição encontrado no citoplasma ligado aos chamados inibidores de NFκB (IκB). A ativação do NFκB por fatores de crescimento e inflamatórios é mediada através das proteínas quinases IκB, que fosforilam IκB, resultando na ubiquitinação IκBα e subsequente degradação proteossômica (Pahl, 1999; Pikarsky et al., 2004; Meng et al., 2010). Consequentemente, o NFκB é liberado do complexo IκB e se transloca para o núcleo, onde se liga em sítios consenso do DNA, ativando a expressão gênica (Pahl, 1999; Pikarsky et al., 2004). A ampla distribuição dos sítios de ligação do NFκB no genoma permite a regulação de um vasto número de genes e a participação em processos celulares fundamentais, como apoptose, proliferação e diferenciação (Pham et al., 2004; Luo et al., 2005). O NFκB responde a várias moléculas, como IL1, TNFα, citocromo P450, melatonina e metaloproteinases da matriz (MMPs) (Pham et al., 2004; Luo et al., 2005) e também aos radicais livres (Gong et al., 2001; Zhou et al., 2001). Estudos recentes demonstraram que o NFκB está envolvido na regulação de genes das enzimas antioxidantes, como a CAT e GSH-Px (Zhou et al., 2001; Meng et al., 2010). Ainda, a desregulação do NFκB está associada a vários tipos de cânceres e o aumento da atividade do NFκβ em células tumorais resultou no aumento da glutatona celular, o que conferiu resistência ao EO (Meng et al., 2010).

1.4 Regulação da angiogênese.

Na próstata, diferentes processos biológicos tais como regulação da proliferação e diferenciação celular, atividade mitogênica, processos secretores e o crescimento tumoral são regulados e/ou influenciados por diferentes polipeptídeos, como os fatores indutores de hipóxia (HIF), os fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e a endostatina (Abdollahi et al., 2003; Berry et al., 2008). Sob a influência de andrógenos, as células estromais produzem diversos fatores de crescimento; alguns deles, na ausência dos andrógenos, podem ativar o AR e induzir diferentes respostas celulares (Berry et al., 2008). Assim, células estromais em associação com a matriz extracelular criam um microambiente que regula o crescimento e a diferenciação funcional das células adjacentes, desempenhando cada um desses, importante papel na manutenção da forma e função tecidual (Cornell et al., 2003).

O microambiente tumoral é caracterizado por flutuação de hipóxia e privação de nutrientes (Semenza, 2003; Kimbro & Simons, 2006) e para que haja crescimento e progressão tumoral, as células cancerosas se adaptam a este ambiente e se utilizam de um

processo fisiológico para garantir oferta suficiente de oxigênio e nutrientes e drenagem de metabólitos: a angiogênese (Eichhorn et al., 2007). A angiogênese é o processo de criação de novos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes e é essencial para o crescimento tumoral e também para processos fisiológicos normais, como crescimento, fertilidade e cicatrização (Campbell, 1997; Folkmann, 1971). A regulação da angiogênese é multifatorial, dependendo do balanço entre fatores indutores e inibitórios no microambiente tecidual e de interações entre células endoteliais, matriz extracelular e vários fatores solúveis (Van Moorselaar & Voest, 2002; Liekens et al., 2001).

O fator indutor de hipóxia 1 (HIF1) é peça chave para adaptação a hipóxia e angiogênese. O HIF1 é composto por um par de heterodímero, HIF1 α e HIF1 β . Em normoxia, HIF1 α é regulado após sua transcrição por ubiquitinação e interação com a proteína supressora de tumor (pVHL) e então é degradado pelo proteassomo 26S. A interação com pVHL é mediada por proteínas contendo domínios prolil-hidroxilase (PHD) que requerem oxigênio (O₂) como cofator. Assim, os níveis de O₂ intracelulares são detectados pelas PHDs que, por sua vez, regulam os níveis de HIF1 α (Kimbrow & Simons, 2006). Quando em hipóxia, a atividade das PHDs é reduzida devido a falta de O₂ e os níveis de HIF1 α aumentam, ele é translocado para o núcleo, heterodimeriza com HIF1 β e o complexo se liga a elementos responsivos a hipóxia (HRE), atuando como fator de transcrição de elementos de resposta a hipóxia, como o VEGF (Kimbrow & Simons, 2006). O aumento de HIF1 α foi correlacionado com fatores diagnóstico e prognóstico do CP e com a presença de metástases ósseas (Du et al., 2003). A expressão de HIF1 α também foi caracterizada na PIN de alto grau e é estimulada pela testosterona (Kimbrow & Simons, 2006).

O VEGF é um polipeptídeo ligante de heparina de 45 kDa, derivado de plaqueta que atua como um mitógeno específico das células endoteliais (Kamath et al., 2009; Zhu et al., 2009). O VEGF estimula todos os aspectos da função endotelial como proliferação, migração, produção de óxido nítrico e permeabilidade da camada de células endoteliais (Waltenberger, 2009). Além disso, a ação do VEGF protege o endotélio contra a apoptose (Waltenberger, 2009). Na próstata, os miofibroblastos produzem e secretam VEGF, o qual estimula a angiogênese tumoral e aumenta a densidade microvascular em resposta à hipóxia e HIF1 α (Levine et al., 1998; Kimbrow & Simons, 2006). Na HBP, a expressão de VEGF está confinada ao estroma, mas no CP, estroma e epitélio podem expressar VEGF (Levine et al., 1998).

A transdução do sinal do VEGF ocorre através de dois receptores de tirosina quinase, localizados na membrana da célula endotelial (VEGFR1 e VEGFR2), sendo o VEGFR2 o principal mediador (Van de Moorselaar & Voest, 2002; Reynolds & Kyprianou, 2006).

Na ausência de vascularização, tumores sólidos crescem somente 1-2mm, demonstrando que o crescimento tumoral e a metástase são dependentes da angiogênese (Abdollahi et al., 2003; Folkman, 2006). Como as células endoteliais são geneticamente estáveis e menos propensas a mutações que lhes permitiriam desenvolver resistência aos fármacos, inibidores da angiogênese têm sido desenvolvidos para atingir aquelas células e bloquear a angiogênese tumoral (Abdollahi et al., 2003; Folkman, 2006). Os inibidores da angiogênese são agrupados em duas classes: diretos e indiretos. Os inibidores diretos inibem a proliferação e migração das células endoteliais ativadas e as conduzem a apoptose (Liekens et al., 2001; O'Reilly et al., 1997). Como exemplos de inibidores diretos, temos o TNP470, que inibe a metionina aminopeptidase 2 (MetAP-2) e promove a parada no ciclo celular da célula endotelial (Sin et al., 1997) e também a endostatina, um fragmento proteolítico C-terminal do colágeno XVIII (proteoglicano encontrado na parede de vasos e na membrana basal) que induz apoptose tanto nas células endoteliais vasculares como nas tumorais (O'Reilly et al., 1997; Schmidt et al., 2004; Eichhorn et al., 2007). Os inibidores indiretos impedem a produção e liberação de fatores pró-angiogênicos e também podem interferir na interação deles com os receptores correspondentes das células endoteliais (Liekens et al., 2001; Fong et al., 1999), como o SU5416 que inibe a fosforilação de VEGFR2 induzida por VEGF (Fong et al., 1999).

O TNP470 exibe um potente efeito inibitório sobre o crescimento e migração da célula endotelial *in vivo* e *in vitro* (Castronovo & Belotti, 1998; Gervaz & Fontollet, 1998) e também demonstrou efeito inibitório no crescimento tumoral e metástases, uma vez que o principal alvo desse fármaco não são as células tumorais em si, mas as células endoteliais de vasos adjacentes ao tumor (Castronovo & Belotti, 1998; Gervaz & Fontollet, 1998). Além disso, o efeito antitumoral do TNP470 é independente do efeito de resistência às drogas, fato que representa um sério problema no tratamento de tumores por meio de drogas antitumorais com ações diretas sobre as células tumorais (Castronovo & Belotti, 1998; Gervaz & Fontollet, 1998).

A endostatina, um fragmento proteolítico C-terminal do colágeno XVIII, é um potente inibidor direto endógeno da angiogênese (O'Reilly et al., 1997; Schmidt et al., 2004) que induz a apoptose tanto nas células endoteliais vasculares como nas tumorais (O'Reilly et al., 1997; Schmidt et al., 2004). A síntese da endostatina ocorre durante a proteólise do colágeno por

ação das metaloproteinases, cuja atividade é aumentada durante a senescência e no câncer (Montico et al., 2014). Macpherson e colaboradores (2003) sugeriram que a atividade antiproliferativa da endostatina ocorre através da sua ligação às moléculas da superfície celular o que, por sua vez, leva a produção intracelular de sinais pró-apoptóticos.

1.5 Alternativas terapêuticas contra o CP

Estima-se que em 2016, 61 mil novos pacientes receberão o diagnóstico de CP no Brasil, sendo esta a segunda causa de morte entre os homens. Nos EUA, estatísticas apontam que 1 em cada 6 homens terá CP, mas apenas 1 em cada 34 vai morrer devido à doença. Em partes, a redução da taxa de mortalidade se deve a campanhas de conscientização que tem levado ao diagnóstico precoce da doença.

O melhor tratamento para o CP depende de uma série de fatores como: o estágio da doença, a idade e a condição de saúde do paciente e a porcentagem de eficácia de cada tratamento. Prostatectomia, quimio e radioterapia, terapia hormonal (castração química) e inibidores da angiogênese são as opções mais comuns. No entanto, médico e paciente podem optar pela não intervenção e apenas acompanhar a doença, principalmente em casos de pacientes idosos ou com problemas de saúde mais graves. (AC Camargo, “Tudo sobre Câncer – Próstata” <http://www.accamargo.org.br/tudo-sobre-o-cancer/prostata/32/>).

Recentemente, o baixo grau de eficácia das terapias atuais contra as lesões prostáticas proliferativas tem motivado o desenvolvimento de imunoterapias, como o Sipuleucel-T. O tratamento é feito com células apresentadoras de antígeno e células dendríticas do próprio paciente que são incubadas com fosfatase ácida prostática e um fator estimulante de colônias de macrófagos para sua ativação. Como a maioria das células cancerosas prostáticas expressa grande quantidade de fosfatase ácida, as células dendríticas e apresentadoras de antígeno, agora ativas, são devolvidas ao paciente para combater o câncer. (Murphy et al., 1996; Bok, 2008; Anassi & Ndefo, 2011).

1.6 O modificador de resposta biológica: PMAPA.

O agregado polimérico anidrido fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio (PMAPA) é um biopolímero não linear, com massa molecular de 320 kDa (Durán & Nunes, 1990; Durán et al., 1997). Os principais componentes da molécula são Mg^{2+} , NH_4^+ , fosfato, ácidos linoleico e palmitoleico e proteína. O conteúdo percentual de proteína está ao redor de 0,5%, com massa molecular de 10 kDa. Os aminoácidos encontram-se distribuídos em porcentagem da seguinte maneira: Asp 7,19%; Thr 3,56%; Ser 7,56%; Glu 8,53%; Pro 0,5%;

Gly 9,69%; Ala 7,46%; Val 1,0%; Met 4,38%, Isoleu 2,54%, Leu 3,03%, Tyr 0,5%, Phe 1,0%, His 2,83%; Lys 3,56%, Trp 1,3% e Arg 35,2% (Durán & Nunes, 1990; Durán et al., 1997).

O PMAPA não demonstrou citotoxicidade ou genotoxicidade em culturas de células V79 e linfócitos humanos, bem como se mostrou atóxico em camundongos, cães e macacos (Durán et al., 1993). Estudos preliminares *in vivo* e *in vitro* indicaram que este imunomodulador mostrou-se capaz de combater doenças infecciosas, virais e alguns tipos de cânceres (Durán et al., 1997; Justo et al., 1999). Justo e colaboradores (2003) verificaram esplenomegalia, mielossupressão e aumento do número de unidades formadoras de colônias de granulócito/macrófagos (CFU-GM) em camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Após 7 dias de tratamento subcutâneo com PMAPA, houve redução de 35% da esplenomegalia e do crescimento tumoral, estimulação da mielopoiese e aumento da produção de IL2 e interferon-gama (IFN γ), com consequente aumento da atividade de células NK (Justo et al., 2003). De acordo com estes autores, o efeito modulador do PMAPA na resposta mielopoiética está relacionado à sua atividade antitumoral, com um possível mecanismo de regulação na produção de CFU-GM e expressão de suas atividades funcionais. Melo e colaboradores (2001) também avaliaram os efeitos do PMAPA no número de CFU-GM na medula óssea de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* e concluíram que este imunomodulador potencializou os mecanismos imunológicos reguladores das células precursoras da medula óssea, as quais estão envolvidas no controle das alterações provocadas pelo tumor no sistema hemolinfopoiético do hospedeiro.

Adicionalmente, demonstrou-se que o PMAPA aumenta os níveis proteicos de TLR2, TLR4 e p53 quando administrado intravesicalmente em animais com CBNMI induzido quimicamente, correlacionando com a regressão tumoral (Fávaro et al., 2012). Ainda, experimentos *in vitro* com células HEK293 relevaram que o tratamento dessas células com PMAPA ativou o NF κ B com estimulação dos TLRs 2 e 4 (Fávaro et al., 2012). Assim, concluiu-se que o PMAPA atua como agonista dos TLRs 2 e 4 e ativa a p53, melhorando o estado imunológico no CBNMI (Fávaro et al., 2012).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O baixo grau de eficácia das terapias contra as lesões prostáticas proliferativas pode estar relacionado aos baixos efeitos dessas terapias sobre os mecanismos de reparo tecidual, angiogênese e enzimas antioxidantes. Em muitos cânceres, a natureza dos RLs que amplifica a lesão primária não é conhecida, tornando-se difícil o planejamento correto da utilização de fármacos com propriedades antioxidantes que eliminem diretamente o RL, impedindo sua reação com alvos celulares e assim, evitando a propagação das lesões provocadas por essas moléculas. O emprego adequado destes fármacos e das estratégias terapêuticas depende de diversos fatores, os quais incluem o entendimento dos processos dependentes dos RLs envolvidos no desenvolvimento de lesões prostáticas, a identificação de compostos que possam atuar como antioxidantes, bem como a sua distribuição na próstata e seu mecanismo de ação. Assim, o conhecimento da interação das diferentes modalidades terapêuticas envolvendo a imunomodulação e o bloqueio da angiogênese com os mecanismos antioxidantes, bem como com as vias hormonais e de reparo tecidual é fundamental para o entendimento dos mecanismos de desenvolvimento de lesões prostáticas.

Assim sendo, os objetivos gerais deste estudo foram desenvolver um modelo animal adequado da carcinogênese prostática, caracterizar e comparar os efeitos morfológicos e moleculares da terapia antiangiogênica associada à imunoterapia com PMAPA no tratamento das lesões prostáticas induzidas quimicamente, bem como estabelecer possíveis mecanismos de ação dessas terapias envolvendo fatores indutores e reparadores de lesão celular, receptores de hormônios sexuais esteroides, angiogênese e enzimas antioxidantes. Tais objetivos gerais serão alcançados através dos seguintes objetivos específicos:

- a) Caracterizar a histopatologia e a progressão das lesões prostáticas induzidas quimicamente no lobo ventral da próstata de ratos frente à terapia antiangiogênica e imunoterapia com PMAPA;
- b) Caracterizar e comparar os efeitos da terapia antiangiogênica e da imunoterapia com PMAPA sobre os fatores indutores e reparadores de lesão celular (TLR4, NFkB, TNF α , e IL6) através da imunohistoquímica e Western Blotting;
- c) Caracterizar e comparar, através de imunohistoquímica e Western blotting os efeitos da terapia antiangiogênica e imunoterapia com PMAPA sobre os receptores de hormônios sexuais esteroides (AR, ER α e ER β);

- d) Caracterizar e comparar, por meio de imunohistoquímica e Western Blotting, o envolvimento da terapia antiangiogênica e da imunoterapia com PMAPA com as enzimas antioxidantes (CAT, GSH-Px1, NRF2 e NOX4);
- e) Caracterizar e comparar os efeitos da terapia antiangiogênica e da imunoterapia com PMAPA sobre o balanço angiogênico e antiangiogênico (HIF1 α , VEGF, Endostatina) através da imunohistoquímica e do Western Blotting;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e procedimento experimental

No presente trabalho, um total de 25 ratos machos da linhagem Fischer 344 foram utilizados. Para a indução das lesões prostáticas, 20 animais receberam dose diária subcutânea de 100 mg/Kg de Cipionato de Testosterona. Posteriormente, os animais foram anestesiados para inoculação na cápsula do lobo ventral prostático de uma dose de 15 mg/Kg de *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU - diluído em tampão citrato, pH 6) a cada 15 dias, totalizando 2 doses. Uma semana após a administração da última dose de MNU, os animais receberam injeções subcutâneas de 5mg/kg de cipionato de testosterona em dias alternados por 120 dias. O método descrito foi aprimorado e patenteado e o pedido encontra-se registrado no INPI (BR1020140231188). Os outros 5 animais foram considerados como controles. Após o período de 120 dias de indução, os animais foram subdivididos em cinco grupos (5 animais cada) identificados na tabela abaixo:

Grupos	Tratamento/dose	Duração	Via
1.Controle (CT)	salina 0,9% (5mg/kg)	3x/semana por 30 dias	subcutânea
2.MNU	salina 0,9% (5mg/kg)	3x/semana por 30 dias	subcutânea
3.MNU+TNP470	TNP470 (15mg/kg)	3x/semana por 30 dias	subcutânea
4.MNU+PMAPA	PMAPA (5mg/kg)	3x/semana por 30 dias	subcutânea
5.MNU+TNP470 +PMAPA	TNP470 (15mg/kg) e PMAPA (5mg/kg)	3x/semana por 30 dias	subcutânea

Todos os animais receberam água e a mesma dieta sólida *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, Paraná, Brasil) e foram alojados em caixas individuais com fundo sólido, forradas com maravalha, em sala com luminosidade (12h de ciclo claro e escuro) e temperatura (20 à 25°C) controladas. Após 150 dias de tratamento, amostras do lobo ventral prostático de todos os animais foram coletadas, pesadas e normalizadas pelo peso corporal de cada animal e submetidas à análise histopatológica, à imunohistoquímica e ao Western Blotting. O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal, sendo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UNICAMP com protocolo número 3053-1.

3.2 Análise histopatológica

Amostras do lobo ventral prostático de todos os animais de cada grupo experimental (n=5) foram coletadas e fixadas em Bouin por 12h. Após a fixação, os tecidos foram lavados

em álcool etílico a 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados com xilol por 2 horas e inclusos em polímeros plásticos (*Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA*). Em seguida, os materiais foram seccionados no micrótomo Biocut 1130 (*Reichert-Jung, Munique, Alemanha*) com espessura de 5 µm, corados com Hematoxilina-Eosina e fotografados no fotomicroscópio Nikon Eclipse Ni-U (*Nikon, Tóquio, Japão*) equipado com câmera Nikon DS-RI-1 (*Nikon, Tóquio, Japão*). O diagnóstico das lesões prostáticas foi baseado em critérios morfológicos de acordo com Shappell et al. (2004).

3.3 Imunohistoquímica

Amostras do lobo ventral prostático de todos os animais de cada grupo experimental, as mesmas utilizadas para as análises histopatológicas, foram utilizadas para as imunomarcações. A seguir, cortes com 5 µm de espessura foram obtidos no micrótomo rotativo *Biocut 1130 (Reichert-Jung, Munique, Alemanha)* e coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6) a 100°C em micro-ondas. O bloqueio da peroxidase endógena foi obtido com H₂O₂ (0,3% em metanol) com posterior incubação em solução bloqueadora com albumina soro bovino (BSA) 3% (*Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA*) em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os anticorpos primários *rabbit polyclonal 251111 (Abbiotec, San Diego, CA, USA)* para TLR4, *rabbit polyclonal ab7970 (Abcam, Cambridge, MA, USA)* para NFκB, *rabbit polyclonal ab6671 (Abcam, Cambridge, MA, USA)* para TNFα, *rabbit polyclonal 251287 (Abbiotec, San Diego, CA, USA)* para IL6, *rabbit polyclonal sc-816 (N-20) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)* para AR, *rabbit monoclonal 04-227 (E115) (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)* para ERα, *rabbit polyclonal 06-629 (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)* para ERβ, *rabbit polyclonal orb100792 (Biorbyt LLC, Berkeley, CAL, USA)* para Catalase, *rabbit polyclonal orb5344 (Biorbyt LLC, Berkeley, CAL, USA)* para GSH-Px1, *rabbit polyclonal sc-722 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)* para NRF2, *rabbit polyclonal orb11151 (Biorbyt LLC, Berkeley, CA, USA)* para NOX4, *rabbit polyclonal 251256 (Abbiotec, San Diego, CA, USA)* para HIF1α, *mouse monoclonal sc-53462 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)* para VEGF e *rabbit polyclonal 251198 (Abbiotec, San Diego, CA, USA)* para Endostatina foram diluídos em BSA 1% e incubados *overnight* a 4 °C. O kit *MACH 4 Universal HRP-Polymer (Biocare Medical, EUA)* foi usado para detecção dos antígenos de acordo com as instruções do fabricante. Os cortes foram

contra-corados com Hematoxilina de Harris e avaliadas no fotomicroscópio *Nikon Eclipse Ni-U* (*Nikon, Tóquio, Japão*) equipado com câmera *Nikon DS-R1-1* (*Nikon, Tóquio, Japão*). Para avaliar a imunorreatividade dos antígenos, foi proposto um novo método de análise que considera a “presença da lesão”, a “localização celular” da marcação e a “atribuição da nota”. O presente método tem como base a classificação do Sistema Gleason e busca atribuir um “valor” para a imunomarcação do compartimento epitelial e estromal, buscando-se criar um espectro de valores que estime a intensidade da cada marcação em determinado compartimento para cada proteína (Tabela 1).

3.3 a) Presença de Lesão no Epitélio. Conforme a condição histopatológica do compartimento epitelial, o mesmo foi dividido em dois grupos: 1) Epitélio normal: sem atipias, sem proliferação celular anormal ou evidências de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas; 2) Epitélio com lesão: epitélio com alguma das lesões descritas na análise histopatológica (AP, NIP, PIA, adenocarcinoma de graus baixo, intermediário e alto).

3.3 b) Localização Celular da Marcação. Em cada grupo citado anteriormente, a marcação foi analisada em três possíveis localizações celulares: supranuclear, intranuclear e citoplasmática, sendo atribuída uma nota para cada compartimento;

3.3 c) Atribuição da Nota. Para cada localização celular, uma nota, de 0 a 3, foi determinada baseada em dois parâmetros:

1) Percentual de Células Marcadas (PCM): seguindo o seguinte padrão na imagem de cada campo no aumento de 400x:

- Nota 0: nenhuma célula marcada;
- Nota 1: $0\% < \text{n}^\circ \text{ de células marcadas} \leq 50\%$
- Nota 2: $50\% < \text{n}^\circ \text{ de células marcadas} < 100\%$
- Nota 3: 100% de células marcadas.

2) Intensidade de Marcação (Int): baseada no acúmulo de grânulos citoplasmáticos na localização celular. Para isto, tomou-se como referência a quantidade de citoplasma/material nuclear visível entre os grânulos, sendo a nota atribuída da seguinte forma:

- Nota 0: sem marcação;
- Nota 1 – leve: é possível ver citoplasma/material nuclear claramente entre os grânulos;
- Nota 2 – moderada: é possível ver citoplasma/material nuclear, porém com predomínio de

acúmulo de grânulos;

- Nota 3 - intensa: a marcação cobre todo o citoplasma/ material nuclear.

A nota final para cada marcação em cada possível localização celular seguirá a seguinte fórmula: $Nota = (PCM)^{int}$, sendo $PCM > 0$ e $int > 0$. Com a ressalva de que, quando não houver marcação ($PCM = 0$ e $int = 0$), não haverá sentido na atribuição da nota.

3.4 Extração de proteínas e Western Blotting

Amostras do lobo ventral prostático de todos os animais de cada grupo experimental ($n=5$) foram coletadas, congeladas e posteriormente, submetidas às análises de *Western Blotting*. As amostras prostáticas foram homogeneizadas em tampão de extração contendo, Triton-x-1%, NaCl 150mM, Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, Hepes 1mM pH 7,6, PMSF 0,2 mM e 10 μ L/mL de coquetel inibidor de proteases (*SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA*). Os extratos do lobo ventral prostático foram obtidos por centrifugação durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de *Bradford* e as leituras feitas pelo leitor de microplaca (*Multi-Mode Microplate Reader Synergy HIM; Bio-Tek Instruments, EUA*). O correspondente a 70 microgramas de proteínas foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente para membranas de nitrocelulose. As membranas foram então bloqueadas com BSA 3% diluído em TBS-T por 1h e incubadas com os mesmos anticorpos primários descritos na imunohistoquímica e nas seguintes concentrações: TLR4 (1:250), NFkB (1:400), TNFa (1:200), IL6 (1:100), AR (1:100), ER α (1:350), ER β (2 μ g/mL), Catalase (1:200), GSH-Px1 (1:200), NRF2 (1:400), NOX4 (1:200), HIF1 α (1:250), VEGF (1:250) e Endostatina (1:100). Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 2h com os mesmos anticorpos primários utilizados na imunohistoquímica e posteriormente, com os anticorpos secundários *anti-rabbit* ou *anti-mouse* conjugados com HRP na diluição de 1:500 em BSA 1%. Após nova série de lavagens com TBS-T, a atividade peroxidásica foi revelada com o substrato diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical Co., St Louis, USA). Os experimentos foram rodados em duplicatas de dois pools, sendo o primeiro pool formado por três animais e o segundo, por dois. A densitometria semiquantitativa das bandas foi feita através do software *ImageJ 1.47v* (National Institute of Health, USA; disponível no sítio <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.) A proteína β -actina foi utilizada como controle endógeno para normalização das leituras das intensidades das bandas.

3.5 Análise estatística

Os valores obtidos após pesagem do lobo ventral e Western Blotting foram submetidos ao teste de Lilliefors para normalidade. Os valores do Western Blotting foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey como *post-hoc*. Os valores do peso do lobo ventral foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, com Student-Newman-Keuls como *post-hoc*. Todas as análises foram realizadas com significância $\leq$ a 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Razão entre o peso do lobo ventral e o peso corporal (plv/pc)

Houve aumento de 163% da razão plv/pc no grupo MNU ($0,0033 \pm 0,0005$) em relação ao grupo controle ($0,0013 \pm 0,0002$; $p=0,0002$). O grupo MNU+PMAPA ($0,0016 \pm 0,0003$) apresentou redução de 54,5% desta razão em comparação ao grupo MNU ($p=0,01$) e ela foi semelhante aos valores dos grupos controle ($0,0013 \pm 0,0002$). Não houve alteração significativa da razão plv/pc nos grupos MNU+TNP470 ($0,0022 \pm 0,0009$) e MNU+TNP470+PMAPA ($0,0023 \pm 0,0012$) em comparação ao grupo MNU (Figura 1).

4.2 Análise histopatológica

O lobo ventral prostático dos animais do grupo controle não apresentou lesões histopatológicas, sendo caracterizado por ácinos de diferentes tamanhos com borda pregueada (Figura 2). O epitélio secretor apresentou-se composto por 2 tipos celulares, uma camada de células basais e uma camada de células colunares (ou luminais) secretoras (Figura 2a, 2b). No estroma prostático, foram verificadas finas fibras colágenas, distribuídas adjacentes ao epitélio e entremeadas às células musculares lisas (Figuras 2a, 2b).

Todos os animais do grupo MNU desenvolveram adenocarcinoma prostático de baixo (20%), intermediário (60%) e alto (20%) graus (Figuras 2e, 2f, 2g, 2h; Tabela 2). Lesões pré-neoplásicas como a neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (HGPIN) e atrofia inflamatória proliferativa (PIA) ocorreram em 80% dos animais (Figuras 2c, 2d; Tabela 2). A HGPIN caracterizou-se por proliferação focal do epitélio, com intensidade variável de atipias citológicas identificadas através de núcleos volumosos e nucléolos proeminentes. As células epiteliais basais foram caracterizadas não demonstrando desorganização estrutural (Figuras 2c, 2j). A PIA, por sua vez, caracterizou-se por ácinos atróficos com epitélio displásico, apresentando mais de uma camada de células de morfologia atípica (núcleo volumoso e nucléolo proeminente). A alteração epitelial foi acompanhada de infiltrado inflamatório intersticial periacinar predominantemente linfocitário (Figuras 2d, 2k). As células epiteliais basais foram caracterizadas não demonstrando desorganização estrutural (Figuras 2d, 2k).

O adenocarcinoma prostático de baixo grau (ABG) foi constituído exclusiva ou predominantemente por ácinos neoplásicos discretos, bem-formados, que se assemelharam aos ácinos normais, porém com ausência das células epiteliais basais. Os núcleos dos ácinos neoplásicos foram volumosos, geralmente ovalados e com nucléolos proeminentes (Figura 2e). No adenocarcinoma prostático de grau intermediário (AGI), também houve ausência das

células epiteliais basais e os ácinos neoplásicos eram pontiagudos e começavam a se fundir (Figuras 2f, 2l). Já o adenocarcinoma prostático de alto grau (AAG) foi caracterizado por rara formação acinar, com células neoplásicas dispostas em cordões ou ninhos e dispersas no estroma (Figura 2g, 2h).

Alterações histopatológicas como atrofia prostática (AP) (Figura 2i) e hiperplasia nodular prostática (HNP) ocorreram em 100% e 60% dos animais do grupo MNU+TNP470, respectivamente (Tabela 2). Lesões pré-neoplásicas como NIP e PIA ocorreram em 60% dos animais desse grupo (Figuras 2j, 1k; Tabela 2). A lesão neoplásica mais frequente no grupo MNU+TNP470 foi o adenocarcinoma de grau intermediário (40%) (Figura 2l; Tabela 2), seguido dos adenocarcinomas prostáticos de baixo (20%) e alto (20%) graus (Tabela 1). Na HNP, notamos a presença de nódulos hiperplásicos estrômato-glandulares bem delimitados, caracterizados por ácinos apresentando lado externo reto e lado interno mostrando epitélio com papilomatose (Figura 2m). O epitélio dos ácinos glandulares mostrou-se revestido por células colunares secretoras e células basais (Figura 2m). O estroma hiperplásico caracterizou-se por hiper celularidade e aumento de fibras colágenas (Figura 2m). A atrofia prostática apresentou ácinos prostáticos com mucosa pouco pregueada (Figuras 2i, 2n). O epitélio secretor foi constituído por células secretoras de formato cuboide, com nítida redução da relação núcleo/ citoplasma (Figuras 2i, 2n), além da presença de células basais.

O grupo MNU+PMAPA apresentou somente ABG (20%), o que representa uma redução de 80% da ocorrência de tumor (Tabela 2). Adicionalmente, a HGPIN e PIA ocorreram em 60% e 20% dos animais, respectivamente (Tabela 2). As alterações histopatológicas mais frequentes nesse grupo foram: HNP (80%) (Figura 2m; Tabela 2), AP (80%) (Figura 2n; Tabela 2), infiltrado inflamatório (II) no estroma (60%) (Figura 2o; Tabela 2) e a presença de microácinos (60%, Tabela 2).

O grupo MNU+TNP470+PMAPA apresentou HGPIN (40%) e não apresentou PIA nem AAG (Tabela 2). Além disso, o ABG e o AGI ocorreram em 40% dos animais, juntamente com o microácino, HNP e AP que ocorreram nas frequências de 100%, 40% e 60%, respectivamente (Tabela 2).

4.3 Imunohistoquímica

4.3.1 Fatores indutores e reparadores de lesão tecidual

TLR4

Ao analisarmos regiões de epitélio normal, notamos um aumento na marcação citoplasmática de TLR4 no grupo MNU (1IN, 27C) em comparação ao grupo controle (1IN,

3C). O tratamento com PMAPA e com a associação dos fármacos não alterou a marcação de TLR4 em comparação ao grupo MNU enquanto o tratamento com TNP470 reduziu a marcação citoplasmática (1IN, 9C) (Tabela 3). Em relação ao estroma, os grupos controle, MNU e MNU+PMAPA apresentaram padrões semelhantes de marcação (Tabela 4). No entanto, o grupo tratado com TNP470, isolado ou em associação com o PMAPA, apresentou redução significativa na marcação do endotélio e das fibras de músculo liso.

Lesões do tipo neoplasia intraepitelial prostática (PIN) do grupo tratado com PMAPA (1IN, 27C) apresentaram aumento da marcação citoplasmática de TLR4 em comparação aquelas do grupo MNU (1IN, 9C). O tratamento com TNP470 reduziu a marcação citoplasmática de TLR4 (1IN, 3C) em comparação ao grupo MNU. A associação dos fármacos também reduziu a marcação citoplasmática de TLR4 em comparação ao grupo MNU (tabela 5, figura 3).

Lesões do tipo atrofia inflamatória proliferativa (PIA) do grupo tratado com PMAPA (1IN, 9C) apresentou o mesmo padrão de marcação de TLR4 que aquelas do grupo MNU (1IN, 9C). As lesões do grupo tratado com TNP470 apresentaram redução na marcação citoplasmática de TLR4 (1IN, 3C) em comparação ao grupo MNU (1IN, 9C) (tabela 5, figura 3).

Regiões atróficas do grupo tratado com PMAPA, isolado ou em associação com TNP470, apresentaram o mesmo padrão de marcação para TLR4 (1IN, 9C). O grupo tratado apenas com TNP-470 apresentou redução na marcação citoplasmática (1IN, 3C) (tabela 5, figura 3).

Com relação ao adenocarcinoma de baixo grau (ABG), os grupos tratados com PMAPA e TNP470, isolados e em associação, apresentaram o mesmo padrão de marcação de TLR4 que o grupo MNU (1IN, 9C) (tabela 5, figura 4).

Considerando o adenocarcinoma de grau intermediário, o grupo tratado apenas com TNP470 apresentou o mesmo padrão de marcação de TLR4 que o grupo MNU (1IN, 9C). O grupo que recebeu a associação dos fármacos apresentou reduzida marcação citoplasmática (1IN, 4C) em comparação ao grupo MNU (tabela 5, figura 4).

Em relação ao adenocarcinoma de alto grau, o grupo tratado com TNP470 apresentou aumento da marcação citoplasmática de TLR4 (1IN, 27C) em comparação ao grupo MNU (1IN, 8C) (tabela 5, figura 4).

NFkB

Considerando regiões de epitélio normal, houve aumento da marcação intranuclear e aumento da marcação citoplasmática de NFkB no grupo MNU (4IN, 9C) em comparação ao grupo controle (2IN, 3C). O grupo tratado com PMAPA apresentou marcação intranuclear de NFkB e mesma marcação citoplasmática (9IN, 9C) que o grupo MNU. O grupo tratado com TNP470 apresentou 40% dos animais com marcação 3IN, 3C e 40%, com marcação 9IN, 9C, apresentando aumento da marcação intranuclear (ausente no grupo MNU) e com alguma semelhança ao grupo tratado com PMAPA. O grupo tratado com ambos os fármacos apresentou padrão de marcação semelhante ao grupo MNU+TNP470 (3IN, 3C). Assim, notamos que ambos os tratamentos induziram a translocação de NFkB para o núcleo, porém o PMAPA isolado foi mais eficaz do que em associação ao TNP470 (tabela 3). Em relação ao estroma, todos os grupos apresentaram padrões de marcação semelhantes entre si (tabela 4).

As lesões do tipo PIN do grupo MNU apresentaram aumento da marcação intranuclear e citoplasmática do NFkB (8IN, 27C e 4IN, 9C) em comparação as regiões de epitélio normal do mesmo grupo (9C). O grupo tratado com PMAPA não apresentou marcação intranuclear de NFkB e apresentou redução da marcação citoplasmática (3C) assemelhando-se a regiões de epitélio normal do grupo controle. O tratamento com TNP470 não alterou a marcação de NFkB em comparação ao grupo MNU. A associação dos tratamentos não reduziu a marcação intranuclear de NFkB (3IN) em comparação ao grupo MNU, mas reduziu a marcação citoplasmática (3C) (tabela 6, figura 5).

As lesões do tipo PIA dos grupos tratados com PMAPA ou TNP470 apresentaram redução da marcação intranuclear e citoplasmática do NFkB (2IN, 3C) em comparação as mesmas lesões do grupo MNU (4IN, 9C) (tabela 6, figura 5).

As regiões atróficas dos animais do grupo PMAPA e TNP470 apresentaram padrões idênticos de marcação do NFkB (4IN, 9C). No entanto, a associação dos fármacos reduziu a marcação intranuclear sem alterar a marcação citoplasmática (2IN, 9C) (tabela 6, figura 5).

O ABG dos grupos tratados com PMAPA isolado e em associação apresentou o mesmo padrão de marcação de NFkB que aquele do grupo MNU (2IN, 3C). O grupo tratado apenas com TNP470 apresentou aumento da marcação intranuclear e da citoplasmática (3IN, 9C) em comparação ao grupo MNU (tabela 6, figura 6).

Considerando o AGI, os grupos tratados com TNP470, isolado e em associação com o PMAPA, apresentaram praticamente o mesmo padrão de marcação que o grupo MNU (3IN, 9C) (tabela 6, figura 6).

Em relação ao AAG, o grupo tratado com TNP470 apresentou padrões semelhantes de marcação intranuclear e modesta redução da marcação citoplasmática (3IN, 3C) em comparação a mesma lesão do grupo MNU (4IN, 8C) (tabela 6, figura 6).

TNF α

As regiões de epitélio normal do grupo MNU apresentaram o mesmo padrão de marcação citoplasmática do TNF α em comparação ao grupo MNU (27C). O epitélio normal dos grupos tratados com P-MAPA e TNP470, isolados ou em associação, apresentou redução da marcação citoplasmática deste fator (9C) em comparação ao MNU (27C) (tabela 3). Com relação aos componentes estromais, todos os grupos apresentaram os mesmos padrões de marcação para o TNF α , com exceção do grupo MNU+PMAPA que apresentou a maior intensidade de marcação estromal (tabela 4).

As lesões do tipo PIN dos grupos tratados com o PMAPA e TNP470, isolados ou em associação, apresentaram ausência de marcação intranuclear e redução da marcação citoplasmática do TNF α (9C) em comparação a mesma lesão do grupo MNU (8IN, 27C) (tabela 7, figura 7).

As lesões do tipo PIA dos grupos tratados com PMAPA ou TNP470 não apresentaram marcação intranuclear de TNF α em comparação às mesmas lesões do grupo MNU (2IN, 3C) (tabela 7, figura 7).

As regiões de atrofia epitelial dos grupos tratados apresentaram o mesmo padrão de marcação do TNF α (9C) e não apresentaram marcação intranuclear para este fator (tabela 7, figura 7).

O ABG do grupo MNU apresentou marcação intranuclear e citoplasmática do TNF α (3IN, 3C). O grupo tratado com PMAPA não apresentou marcação intranuclear do TNF α , porém mostrou aumento da marcação citoplasmática (9C). Os grupos que receberam TNP470, isolado ou em associação com o PMAPA, não apresentaram marcação intranuclear do TNF α e apresentaram a mesma marcação citoplasmática (3C) do ABG no grupo MNU (tabela 7, figura 8).

O AGI do grupo tratado com TNP470 apresentou modesta redução da marcação citoplasmática do TNF α (2IN, 3C) em comparação ao AGI do grupo MNU (3IN, 9C). O AGI do grupo tratado com TNP470+PMAPA não apresentou marcação intranuclear do TNF α (9C) e apresentou a mesma marcação citoplasmática do grupo MNU (3IN, 9C) (tabela 7, figura 8).

O AAG do grupo tratado com TNP470 apresentou menor intensidade de marcação citoplasmática do TNF α em comparação ao AAG do grupo MNU (3IN, 9C) (tabela 7, figura 8).

IL6

As regiões de epitélio normal do grupo MNU apresentou o mesmo padrão de marcação citoplasmática de IL6 que o grupo controle (9C). O grupo tratado com PMAPA passou a apresentar marcação intranuclear, com redução da marcação citoplasmática (3IN, 3C) em comparação ao grupo MNU. O grupo tratado com TNP470 apresentou marcação intranuclear semelhante ao grupo PMAPA e a mesma marcação citoplasmática do grupo MNU (4IN, 9C). O grupo tratado com a associação dos fármacos apresentou o mesmo padrão de IL6 do grupo TNP470 (4IN, 9C) (tabela 3). Com relação à marcação estromal, os grupos tratados com MNU, não apresentaram marcação de IL6 nas fibras musculares lisas, sendo que esta esteve presente no grupo controle. De modo geral, houve um aumento na marcação estromal de IL6 nos grupos controle e MNU+PMAPA (tabela 4).

As lesões do tipo PIN do grupo MNU apresentaram moderada marcação citoplasmática de IL6 (9C), idêntica à apresentada pelo epitélio normal do grupo MNU. O grupo tratado com PMAPA apresentou dois padrões de marcação para IL6: 1) 9IN, 9C e 2) 3IN, 3C; demonstrando marcação intranuclear, a qual não foi detectada no grupo MNU. Os grupos tratados com TNP470, isolado e em associação com o PMAPA, apresentaram ausência de marcação intranuclear e redução da marcação citoplasmática (3C) em comparação ao grupo MNU (tabela 8, figura 9).

As lesões do tipo PIA dos grupos PMAPA e TNP470 apresentaram redução da marcação citoplasmática (3C) de IL6 e ausência de marcação intranuclear em comparação a mesma lesão do grupo MNU (4IN, 9C) (tabela , figura 9).

As regiões de atrofia epitelial do grupo PMAPA apresentaram dois padrões de marcação de IL6: 1) 9IN, 9C e 2) 3IN, 3C. O grupo tratado com TNP470 (9IN, 9C) apresentou padrão de marcação semelhante ao grupo PMAPA. O grupo tratado com ambos os fármacos apresentou marcação semelhante ao grupo tratado apenas com PMAPA (tabela 8, figura 9).

O ABG do grupo PMAPA apresentou a mesma marcação de IL6 que o grupo MNU (3IN, 3C). Os tratamentos com TNP470, isolado ou em associação com o PMAPA, apresentaram o mesmo padrão de marcação de IL6 (2IN, 3C), que por sua vez, pouco diferiu daquele apresentado pelo grupo MNU (tabela 8, figura 10).

Os AGI dos grupos MNU, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA apresentaram o mesmo padrão de marcação de IL6 (2IN, 3C) (tabela 8, figura 10).

Com relação ao AAG, houve aumento da marcação intranuclear e citoplasmática no grupo tratado com TNP470 (4IN, 9C) em comparação ao grupo MNU (1IN, 3C) (tabela 8, figura 10).

4.3.2 Receptores hormonais

AR

Ao analisar regiões de epitélio normal, nossos dados demonstram que a administração de MNU aumentou a intensidade da marcação intranuclear do AR (27IN, 3C) em comparação ao grupo controle (8IN, 3C). Os grupos que receberam tratamento com PMAPA, TNP470 e com TNP470+PMAPA apresentaram marcação intranuclear semelhante ao grupo controle (8IN), porém com ausência de marcação citoplasmática (tabela 9). Quanto ao compartimento estromal, os grupos tratados com PMAPA, TNP470 e com TNP470+PMAPA apresentaram pouca ou nenhuma marcação de AR no endotélio, estando ela presente em todos os animais controles e em 60% dos animais tratados com MNU, sugerindo uma possível infrarregulação dos níveis de AR após os tratamentos. Adicionalmente, houve pouca alteração nos demais componentes analisados (tabela 10).

Analisando a imunomarcação de AR para lesões do tipo PIN, notamos que os grupos MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA apresentaram os mesmos padrões de marcação intranuclear do grupo MNU (4IN e 27IN), mas com redução da marcação citoplasmática nos grupos que receberam PMAPA sozinho ou associado ao TNP470 (tabela 11, figura 11).

Considerando as lesões do tipo PIA, os tratamentos com PMAPA ou TNP470 pouco alteraram o padrão de marcação intranuclear de AR em comparação ao grupo MNU. No entanto, houve pequena redução da marcação citoplasmática no grupo tratado com TNP470 (tabela 11, figura 11).

Em relação a AP, os grupos tratados apresentaram o mesmo padrão de marcação intranuclear (8IN) e ausência de marcação citoplasmática de AR, sendo este o mesmo padrão observado em regiões de epitélio normal após o tratamento (tabela 11, figura 11).

Considerando o ABG, os tratamentos com PMAPA e TNP470 aumentaram a marcação intranuclear de AR e reduziram a citoplasmática (8IN, 0C) em comparação ao grupo MNU (4IN, 3C) (tabela 11, figura 12).

Considerando o AGI, não houve alteração da marcação de AR no grupo MNU em comparação ao ABG do mesmo grupo (4IN, 3C). O tratamento com TNP470 manteve o padrão de marcação intranuclear e reduziu a marcação citoplasmática de AR (4IN, 0C) em comparação ao grupo MNU. O tratamento combinado aumentou a marcação intranuclear e reduziu a citoplasmática (8IN, 0C) (tabela 11, figura 12).

Considerando o adenocarcinoma de alto grau, não houve alteração da marcação de AR no grupo MNU em comparação ao ABG e AGI do mesmo grupo (4IN, 3C). O tratamento com TNP470 não alterou este padrão de marcação (tabela 11, figura 12).

ER α

Regiões de epitélio normal do grupo MNU apresentaram maior intensidade de marcação intranuclear e citoplasmática de ER α (4IN, 9C) em comparação ao grupo controle (1IN, 2C). O tratamento com PMAPA reduziu significativamente a marcação intranuclear de ER α (1IN, 3C) em comparação ao grupo MNU. O tratamento com TNP470 isolado praticamente não alterou o padrão de marcação de ER α (3IN, 3C). A associação dos tratamentos reduziu a marcação intranuclear de ER α (2IN, 3C) de modo semelhante à administração de PMAPA isolado (tabela 9). Com relação estroma, não houve alteração significativa do padrão de marcação de ER α entre os grupos estudados (tabela 10).

Lesões do tipo PIN do grupo MNU (4IN, 9C) apresentaram o mesmo padrão de marcação de ER α que regiões de epitélio normal do mesmo grupo (4IN, 9C). Os tratamentos com PMAPA e TNP470 isoladamente reduziram significativamente a marcação intranuclear de ER α (1IN, 3C) em comparação ao grupo MNU. A associação dos fármacos não alterou o padrão de marcação intranuclear em comparação ao MNU. Assim, sugerimos que as lesões do tipo PIN dos grupos tratados apresentem menor capacidade proliferativa que as do grupo MNU (tabela 12, figura 13).

Lesões do tipo atrofia inflamatória proliferativa (PIA) dos grupos tratados com TNP470 ou PMAPA apresentaram o mesmo padrão de marcação do grupo MNU (2IN, 3C), ainda que a frequência dessas lesões no grupo tratado com PMAPA seja bem menor em comparação a frequência no grupo MNU, redução esta não observada no grupo tratado com TNP470. De modo intrigante, a associação entre os fármacos foi a melhor abordagem contra este tipo de lesão que não apareceu nos animais que receberam ambos os tratamentos (tabela 12, figura 13).

Regiões atróficas dos grupos tratados com PMAPA ou TNP470 apresentaram o mesmo padrão de marcação de ER α (2IN, 3C), sendo estes menores que o observado para o

epitélio normal do grupo MNU (4IN, 9C). Deste modo, sugerimos que os tratamentos tenham reduzido a capacidade proliferativa também em condições de atrofia epitelial (tabela 12, figura 13).

O ABG dos grupos tratados apresentaram os mesmos padrões de marcação de ER α que o grupo MNU (2IN, 3C) (tabela 12, figura 14).

O AGI dos grupos tratados com TNP470 e com TNP470+PMAPA apresentaram o mesmo padrão de marcação intranuclear de ER α que o do grupo MNU (4IN, 9C). Ainda, houve aumento da marcação intranuclear de ER α no AGI do grupo MNU (4IN, 9C) em comparação ao ABG do mesmo grupo (2IN, 3C), demonstrando que o aumento de ER α intranuclear acompanhou a progressão tumoral em nosso modelo (tabela 12, figura 14).

O AAG do grupo MNU apresentou redução da marcação intranuclear e citoplasmática de ER α (1IN, 1C) em comparação ao adenocarcinoma de grau intermediário do mesmo grupo (4IN, 9C). O tratamento com TNP470 causou aumento da marcação nuclear e citoplasmática de ER α . Assim, demonstramos que o TNP470 pode ter efeitos diferentes em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas (tabela 12, figura 14).

ER β

Regiões de epitélio normal do grupo controle e do grupo tratado com MNU apresentaram padrões semelhantes de marcação citoplasmática de ER β porém, no grupo MNU houve ligeiro aumento na intensidade da marcação intranuclear (4IN, 9C, tabela 9). O grupo tratado com PMAPA apresentou o mesmo padrão de marcação do grupo controle (1IN, 3C). O tratamento com TNP470 isolado ou em associação com PMAPA não alterou o padrão de marcação do epitélio normal em comparação ao grupo MNU. Assim, podemos inferir que o ligeiro aumento de ER β no epitélio normal do grupo MNU pode ter contribuído para a manutenção do fenótipo normal diante de um microambiente carcinogênico. Quanto ao compartimento estromal, todos os grupos apresentaram padrões semelhantes de marcação dos componentes analisados (tabela 10).

Considerando-se lesões do tipo PIN, o grupo tratado com PMAPA apresentou o mesmo padrão de marcação observado no grupo MNU (4IN, 9C). O tratamento com TNP470 isolado causou ligeira redução da marcação intranuclear de ER β e manteve os níveis citoplasmáticos idênticos ao grupo MNU. A associação dos tratamentos reduziu ainda mais a intensidade da marcação intranuclear de ER β sem alterar o padrão de marcação citoplasmática (1IN, 9C). Diante deste cenário, podemos inferir que as lesões do tipo PIN dos

grupos que receberam TNP470 apresentam menor potencial antiproliferativo em comparação ao grupo que recebeu PMAPA, ainda que as lesões deste apresentem o mesmo padrão de marcação do grupo MNU (tabela 13, figura 15).

Com relação a lesões do tipo PIA, os grupos que receberam TNP470 e PMAPA isoladamente apresentaram o mesmo padrão de marcação das lesões do grupo MNU. Entretanto, ressaltamos que a associação dos fármacos foi mais eficaz, uma vez que esse tipo de lesão não ocorreu no grupo que recebeu ambos os tratamentos. Adicionalmente, destacamos a significativa redução na frequência de PIA no grupo tratado apenas com PMAPA em comparação ao grupo MNU e TNP470 (tabela 13, figura 15).

Considerando que a atrofia prostática tenha ocorrido apenas nos grupos tratados com PMAPA e TNP470, isoladamente ou em conjunto, e que isso possa explicar a redução de peso do lobo ventral prostático nesses animais, achamos importante caracterizar o padrão de marcação de ER β para assegurar que os tratamentos tenham interferido na capacidade antiproliferativa do epitélio. Deste modo, verificamos que os grupos tratados apresentaram o mesmo padrão de marcação para ER β que por sua vez, foi semelhante ao padrão do epitélio normal do grupo MNU (tabela 13, figura 15), indicando manutenção da capacidade antiproliferativa.

Com relação ao adenocarcinoma de baixo grau, houve redução da marcação intranuclear e citoplasmática de ER β no grupo MNU (1IN, 3C) em comparação ao epitélio sem lesão do mesmo grupo (4IN, 9C). O tratamento com PMAPA ou TNP470 isoladamente, aumentou modestamente a marcação intranuclear de ER β , o que não foi observado com a associação dos fármacos (1IN, 9C). Assim, o TNP470 e o PMAPA parecem ter aumentado a capacidade antiproliferativa no adenocarcinoma de baixo grau em comparação ao grupo não tratado (tabela 13, figura 16).

Considerando o AGI, houve redução da marcação intranuclear no grupo MNU em comparação ao epitélio normal do mesmo grupo, padrão este que foi idêntico ao adenocarcinoma de baixo grau (1IN, 3C). Neste caso, o tratamento com TNP470 não alterou a marcação intranuclear de ER β , ainda que tenha aumentado a marcação citoplasmática (1IN, 29C). O grupo que recebeu a associação dos fármacos apresentou a mesma marcação que o grupo MNU (1IN, 3C) (tabela 13, figura 16).

Com relação ao AAG, houve redução da marcação intranuclear e citoplasmática no grupo MNU em comparação ao epitélio normal do mesmo grupo, havendo modesta redução da marcação citoplasmática em comparação ao ABG e AGI (1IN, 3C). O grupo que recebeu

TNP470 apresentou padrões de marcação de ER β muito semelhantes ao grupo MNU, com discreto aumento da marcação citoplasmática (tabela 13, figura 16).

4.3.3 Enzimas antioxidantes e os radicais livres

Catalase

Considerando regiões de epitélio normal, todos os grupos apresentaram o mesmo padrão de marcação citoplasmática da Catalase (9C) (tabela 14). Com relação aos componentes estromais, notamos que todos os grupos que receberam MNU apresentaram marcação de Catalase no endotélio, nas fibras de musculo liso e nas células inflamatórias enquanto o grupo controle não apresentou marcação das fibras de musculo liso (tabela 15).

Lesões do tipo PIN do grupo MNU apresentaram marcação intranuclear e citoplasmática de Catalase (4IN, 9C) e apresentaram o mesmo padrão de marcação no grupo tratado com TNP470 (4IN, 9C). As PIN dos grupos que receberam PMAPA isolado e em associação ao TNP470 apresentaram o mesmo padrão de marcação citoplasmática (9C) e ausência de marcação intranuclear da catalase em comparação ao grupo MNU (tabela 16, figura 17).

As lesões do tipo PIA do grupo MNU apresentaram marcação intranuclear e citoplasmática da Catalase (3IN, 3C). As PIAs dos grupos tratados com PMAPA ou TNP470 apresentaram apenas marcação citoplasmática de Catalase (3C). Notamos ainda, que a PIA do grupo MNU apresentou redução da marcação de Catalase citoplasmática em comparação as regiões de epitélio normal do mesmo grupo (tabela 16, figura 17).

As regiões atróficas dos grupos tratados apresentaram o mesmo padrão de marcação da Catalase (9C) que, por sua vez, foi idêntico às regiões de epitélio normal (tabela 16, figura 17).

Considerando o ABG, houve redução da marcação intranuclear e citoplasmática da Catalase no grupo MNU (2IN, 3C) em comparação à PIN do mesmo grupo (4IN, 9C). Os ABG dos grupos tratados apresentaram a mesma marcação citoplasmática (3C) e ausência de marcação intranuclear da Catalase em comparação ao grupo MNU (tabela 16, figura 18).

O AGI do grupo MNU apresentou o mesmo padrão de marcação da Catalase (2IN, 3C) que o ABG do mesmo grupo (2IN, 3C). Os AGI dos grupos que receberam TNP470 não apresentaram marcação intranuclear da Catalase e mantiveram o padrão de marcação citoplasmática (3C) (tabela 16, figura 18).

O AAG do grupo MNU apresentou ausência de marcação da Catalase em comparação ao ABG e AGI do mesmo grupo. O AAG do grupo tratado com TNP470 apresentou modesta marcação citoplasmática (3C) em comparação ao grupo MNU (tabela 16, figura 18).

GSH-Px1

As regiões de epitélio normal de todos os grupos apresentaram o mesmo padrão de marcação da enzima GSH-Px1 (9C) (tabela 14). Todos os grupos também apresentaram marcação de todos os componentes estromais (endotélio, músculo liso e células inflamatórias) (tabela 15).

As lesões do tipo PIN do grupo MNU passaram a apresentar marcação intranuclear, com redução da marcação citoplasmática (2IN, 3C) em comparação às regiões de epitélio normal do mesmo grupo. O tratamento com PMAPA não alterou o padrão de marcação da GSH-Px1 na PIN em comparação ao grupo MNU. O tratamento com TNP470 aumentou a marcação intranuclear e citoplasmática da GSH-Px1 (4IN, 9C) em comparação ao grupo MNU. A associação dos tratamentos manteve o padrão de marcação intranuclear e aumentou a marcação citoplasmática (2IN, 9C) em comparação ao grupo MNU (tabela 17, figura 19).

As lesões do tipo PIA do grupo MNU apresentaram o mesmo padrão de marcação de GSH-Px1 que as lesões tipo PIN do mesmo grupo (2IN, 3C). As PIAs do grupo tratado com PMAPA não apresentaram marcação intranuclear e houve aumento da marcação citoplasmática (9C) em comparação as mesmas lesões do grupo MNU. No grupo tratado com ambos os fármacos, houve aumento da marcação intranuclear e citoplasmática de GSH-Px1 (4IN, 9C) em comparação ao grupo MNU (tabela 17, figura 19).

As regiões atróficas dos grupos tratados apresentaram o mesmo padrão de marcação de GSH-Px1 (2IN, 3C), que por sua vez foi idêntico ao padrão das lesões PIN e PIA do grupo MNU (tabela 17, figura 19).

O ABG do grupo MNU apresentou o mesmo padrão de marcação da GSH-Px1 que as lesões PIN e PIA do mesmo grupo (2IN, 3C). Nenhum dos tratamentos alterou o padrão de marcação da GSH-Px1 no ABG (tabela 17, figura 20).

O AGI do grupo MNU apresentou o mesmo padrão de marcação de GSH-Px1 que o ABG do mesmo grupo (2IN, 3C). Os tratamentos com TNP470, isolado ou em associação com o PMAPA, não alteraram esta marcação (tabela 17, figura 20).

O AAG do grupo MNU apresentou redução da marcação intranuclear e citoplasmática da GSH-Px1 (1IN, 1C) em comparação ao ABG e AGI (2IN, 3C). O tratamento com TNP470

aumentou a marcação citoplasmática e reduziu a marcação intranuclear desta enzima (3C) no AAG em comparação ao grupo MNU (tabela 17, figura 20).

NRF2

As regiões de epitélio normal do grupo MNU apresentaram redução da marcação intranuclear de NRF2 (4IN, 9C) em comparação as mesmas regiões do grupo controle (8IN, 9C). Nenhum dos tratamentos alterou a marcação deste fator em comparação ao grupo MNU (tabela 14). Com relação aos componentes estromais, houve aumento na frequência da marcação de NRF2 no endotélio, nas fibras de musculo liso e nas células inflamatória do grupo MNU em comparação ao controle. Os componentes estromais do grupo tratado com PMAPA apresentaram a mesma frequência de marcação deste fator que o grupo MNU. O tratamento com TNP470 levou a ausência de marcação de NRF2 nas fibras de musculo liso e manteve a marcação dos demais componentes. A associação dos tratamentos levou a maior frequência de marcação de NRF2 em todos os componentes do estroma (tabela 15).

As lesões do tipo PIN do grupo MNU apresentaram o mesmo padrão de marcação de NRF2 que as regiões de epitélio normal do mesmo grupo (4IN, 9C). Os grupos tratados com PMAPA ou com TNP470 apresentaram redução da marcação intranuclear e citoplasmática deste fator (2IN, 3C) em comparação as lesões tipo PIN do grupo MNU. A associação dos fármacos reduziu a marcação intranuclear e não alterou a citoplasmática (2IN, 9C) em comparação a PIN do grupo MNU (tabela 18, figura 21).

As lesões do tipo PIA do grupo MNU apresentam a mesma marcação das lesões tipo PIN (4IN, 9C). Os tratamentos com PMAPA ou com TNP470 reduziram as marcações intranuclear e citoplasmática do NRF2 (2IN, 3C) em comparação ao grupo MNU (4IN, 9C) (tabela 18, figura 21).

As regiões de atrofia epitelial dos grupos tratados com PMAPA e com PMAPA+TNP470 apresentaram o mesmo padrão de marcação de NRF2 (4IN, 9C) que as regiões de epitélio normal do grupo MNU. O tratamento com TNP470 reduziu a marcação intranuclear e citoplasmática de NRF2 (2IN, 3C) em comparação a marcação do epitélio normal do grupo MNU (4IN, 9C) (tabela 18, figura 21).

O ABG do grupo MNU apresentou redução da marcação intranuclear e citoplasmática de NRF2 (2IN, 3C) em comparação às lesões do tipo PIN e PIA do mesmo grupo (4IN, 9C). Os ABGs dos grupos tratados com PMAPA ou com TNP470 apresentaram a mesma marcação de NRF2 que o ABG do grupo MNU (2IN, 3C). A associação dos fármacos fez com que houvesse redução da marcação intranuclear e aumento da marcação citoplasmática

de NRF2 (1IN, 9C) no ABG em comparação a mesma lesão do grupo MNU (2IN, 3C) (tabela 18, figura 22).

O AGI do grupo MNU apresentou o mesmo padrão de marcação de NRF2 que o ABG do mesmo grupo. O tratamento com TNP470 aumentou as marcações intranuclear e citoplasmática (4IN, 9C) em comparação ao grupo MNU (2IN, 3C). A associação dos fármacos reduziu a marcação intranuclear e manteve o padrão da marcação citoplasmática de NRF2 (3C) em comparação ao grupo MNU (tabela 18, figura 22).

O AAG do grupo MNU apresentou redução das marcações intranuclear e citoplasmática de NRF2 (1IN, 1C) em comparação ao ABG do mesmo grupo (2IN, 3C). O tratamento com TNP470 aumentou as marcações intranuclear e citoplasmática de NRF2 (8IN, 27C) em comparação ao AAG do grupo MNU (tabela 18, figura 22).

NOX4

As regiões de epitélio normal do grupo MNU apresentaram dois padrões de marcação de NOX4: 1) 4IN, 9C e 2) 8IN, 9C, ilustrando manutenção da intensidade da marcação citoplasmática (9C) e redução (4IN) ou manutenção (8IN) da marcação intranuclear em comparação ao epitélio normal do grupo controle (8IN, 9C). Os grupos tratados apresentaram epitélio normal com pouca alteração do padrão de marcação de NOX4 em comparação ao grupo MNU, havendo maior intensidade na marcação intranuclear no grupo tratado com PMAPA (8IN, 9C) do que no grupo tratado com TNP470 (4IN, 9C) (tabela 14). Todos os grupos apresentaram a mesma frequência de marcação dos elementos estromais, exceto o grupo tratado com TNP470 que apresentou redução na frequência de marcação das fibras musculares lisas (tabela 15).

Houve aumento da marcação intranuclear de NOX4 (27IN, 9C) nas lesões tipo PIN do grupo MNU em comparação as regiões de epitélio normal do mesmo grupo (4IN, 9C; 8IN, 9C). Todos os grupos tratados apresentaram redução da marcação intranuclear de NOX4 (8IN, 9C) em comparação ao grupo MNU (27IN, 9C) (tabela 19, figura 23).

As lesões do tipo PIA do grupo MNU apresentaram dois padrões de marcação para NOX4: 1) 9IN, 9C e 2) 4IN, 9C. O tratamento com PMAPA reduziu a marcação citoplasmática de NOX4 (3IN, 3C) em comparação ao grupo MNU. O tratamento com TNP470 não alterou a marcação de NOX4 (4IN, 9C) em comparação ao grupo MNU (tabela 19, figura 23).

As regiões de atrofia epitelial do grupo tratado com PMAPA apresentaram dois padrões de marcação de NOX-4: 1) 4IN, 3C e 2) 8IN, 9C. O grupo tratado com TNP470

apresentou marcação de NOX4 com padrão 8IN, 3C enquanto o grupo tratado com ambos os fármacos apresentou 8IN, 9C (tabela 19, figura 23).

O ABG do grupo MNU apresentou redução da marcação intranuclear de NOX4 e manutenção da citoplasmática (8IN, 9C) em comparação às lesões tipo PIN do mesmo grupo (27IN, 9C). O ABG do grupo tratado com PMAPA apresentou o mesmo padrão de marcação de NOX4 que o ABG do grupo MNU (8IN, 9C). Os tratamentos com TNP470, isolado ou em associação com PMAPA, levaram a uma redução das marcações intranucleares e citoplasmáticas de NOX4 no ABG (4IN, 3C) em comparação ao grupo MNU (tabela 19, figura 24).

O AGI do grupo MNU apresentou redução da marcação intranuclear de NOX4 (4IN, 9C) em comparação ao ABG (8IN, 9C) do mesmo grupo. Os grupos tratados com TNP470, isolado ou em associação, apresentaram AGI com menor intensidade da marcação citoplasmática de NOX4 (4IN, 3C) em comparação ao AGI do grupo MNU (4IN, 9C) (tabela 19, figura 24).

O AAG do grupo MNU apresentou redução de NOX4 (1IN, 1C) em comparação ao ABG (8IN, 9C) e ao AGI (4IN, 9C) do mesmo grupo. O AAG do grupo tratado com TNP470 apresentou aumento das marcações intranuclear e citoplasmática (4IN, 3C) em comparação ao AAG do grupo MNU (tabela 19, figura 24).

4.3.4 Fatores reguladores da angiogênese

HIF1 α

As regiões de epitélio normal do grupo MNU apresentaram aumento da marcação intranuclear e citoplasmática de HIF1 α (27SN e 3C) em comparação às mesmas regiões do grupo controle (sem marcação). Não houve marcação de HIF1 α nas regiões de epitélio normal dos grupos MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA. O grupo tratado com TNP470 apresentou a mesma marcação (27SN, 3C) que o grupo MNU (Tabela 20). Com relação aos componentes estromais, houve aumento na porcentagem de animais com marcação de células inflamatórias e de fibras de músculo liso no grupo MNU em comparação ao grupo controle e não houve alteração da porcentagem de animais com marcação do endotélio. O grupo tratado com PMAPA apresentou redução na frequência de marcação do endotélio e das fibras de músculo liso e pouca alteração da marcação das células inflamatórias em comparação ao grupo MNU. Houve pouca alteração na frequência de marcação dos componentes estromais do grupo tratado com TNP470 em comparação ao grupo MNU. O grupo tratado com TNP470

e com PMAPA apresentou redução da frequência de marcação do endotélio e de fibras de músculo liso e pouca alteração na frequência de marcação de células inflamatórias em comparação ao grupo MNU (tabela 21).

Não houve marcação de HIF1 α nas lesões do tipo PIN dos grupos tratados com PMAPA em comparação ao grupo MNU (27SN, 9C). As lesões do tipo PIN do grupo tratado apenas com TNP470 apresentaram dois padrões de marcação mais frequentes: 1) 27SN, 3C e 2) 9C, indicando redução das marcações citoplasmática e supranuclear de HIF1 α em alguns animais em comparação ao grupo MNU (Tabela 22, figura 25).

Houve redução da marcação citoplasmática e intranuclear de HIF1 α nas lesões do tipo PIA do grupo tratado com PMAPA (0IN, 1C) em comparação as mesmas lesões do grupo MNU (1IN, 3C e 1IN, 9C). O tratamento com TNP470 pouco alterou o padrão de marcação de HIF1 α na PIA (9C) em comparação ao grupo MNU (Tabela 22, figura 25).

As regiões de AP dos grupos que receberam PMAPA não apresentaram marcação de HIF1 α enquanto as do grupo tratado apenas com TNP470 apresentaram moderada marcação intranuclear e citoplasmática deste fator (8IN, 9C) (Tabela 22, figura 25).

O ABG do grupo MNU apresentou o mesmo padrão de marcação de HIF1 α (27SN, 9C) que a PIN do mesmo grupo (27SN, 9C). Os ABGs dos grupos tratados com PMAPA não apresentaram marcação de HIF1 α . O tratamento apenas com TNP470 aumentou as marcações citoplasmática e intranuclear e reduziu a marcação supranuclear de HIF1 α (0SN, 1IN, 27C) no ABG em comparação ao grupo MNU (Tabela 22, figura 26).

O AGI do grupo MNU apresentou dois padrões de marcação de HIF1 α mais frequentes: 1) 1IN, 9C e 2) 8IN, 27C. Não houve alteração da marcação deste fator no grupo tratado apenas com TNP470 (8IN, 27C) em comparação ao grupo MNU. O AGI do grupo tratado com TNP470 e PMAPA não apresentou marcação de HIF1 α (Tabela 22, figura 26).

O AAG do grupo MNU apresentou redução de HIF1 α (1IN, 2C) em comparação ao ABG e AGI do mesmo grupo. O AAG do grupo tratado com TNP470 apresentou aumento da marcação citoplasmática (1IN, 9C) em comparação ao grupo MNU (Tabela 22, figura 26).

VEGF

As regiões de epitélio normal do grupo MNU apresentaram dois padrões de marcação predominantes: 1) 27SN, 3C e 2) 3C, ilustrando manutenção e redução de VEGF em comparação as mesmas regiões do grupo controle (27SN, 3C). Os grupos tratados com PMAPA e TNP470, isolados ou em conjunto, apresentaram regiões normais com padrões de

marcação de VEGF semelhantes aos do grupo MNU (Tabela 20). Com relação aos componentes estromais, houve aumento na frequência de marcação de células inflamatórias (100%) e redução na frequência de marcação do endotélio (20%) no grupo MNU em comparação ao grupo controle (40%, 60%, respectivamente). No grupo tratado com PMAPA, houve aumento na frequência de marcação do endotélio (100%) e das fibras de músculo liso (80%) e redução na frequência de marcação das células inflamatórias (60%) em comparação ao grupo MNU. Houve pouca ou nenhuma alteração na frequência de marcação dos componentes estromais do grupo tratado com TNP470 em comparação ao grupo MNU. O grupo que recebeu ambos os tratamentos apresentou aumento na frequência de marcação do endotélio (60%) e das fibras de músculo liso (80%) e pouca alteração na frequência de marcação das células inflamatórias (80%) em comparação ao grupo MNU (Tabela 21).

As lesões do tipo PIN do grupo MNU apresentaram dois padrões de marcações de VEGF: 1) 27SN, 9C e 2) 27C. O grupo tratado apenas com PMAPA também apresentou dois padrões de marcação de VEGF para a PIN: 1) 9SN, 3C e 2) 9C, indicando redução das marcações citoplasmática e supranuclear de VEGF em comparação ao grupo MNU. O grupo que recebeu apenas TNP470 também apresentou redução das marcações supranuclear e citoplasmática de VEGF (0SN, 3C) em comparação à PIN do grupo MNU. O grupo tratado com ambos os fármacos apresentou redução da marcação supranuclear e manutenção da citoplasmática (9C) em comparação à PIN do grupo MNU (Tabela 23, figura 27).

As lesões do tipo PIA do grupo tratado apenas com PMAPA apresentaram 2 padrões de marcação de VEGF: 1) 27SN, 9C e 2) 3C; sugerindo aumento da marcação supranuclear em alguns animais em comparação ao grupo MNU (9C). O tratamento com TNP470 reduziu a marcação citoplasmática (3C) de VEGF na PIA em comparação ao grupo MNU (Tabela 23, figura 27).

As regiões de AP do grupo tratado com PMAPA apresentaram moderada marcação intranuclear (8IN) e intensa marcação citoplasmática de VEGF (27C). O grupo tratado apenas com TNP470 apresentou AP com intensa marcação supranuclear (27SN) e fraca marcação citoplasmática (3C) deste fator. A AP do grupo tratado com ambos os fármacos apresentou intensa marcação supranuclear (27SN) e moderada marcação citoplasmática (9C) de VEGF (Tabela 23, figura 27).

O ABG do grupo MNU apresentou aumento das marcações intranuclear e citoplasmática de VEGF (8IN, 27C) em comparação a PIA (9C) do mesmo grupo. O tratamento com PMAPA reduziu as marcações intranuclear e citoplasmática de VEGF (0IN, 9C) no ABG em comparação ao grupo MNU. O ABG do grupo tratado apenas com TNP470

não apresentou marcação de VEGF. O ABG do grupo tratado com ambos os fármacos apresentou dois padrões de marcação de VEGF: 1) 9C e 2) 27C, indicando redução da marcação intranuclear e manutenção da citoplasmática em comparação ao grupo MNU (Tabela 23, figura 28).

O AGI do grupo MNU apresentou redução de VEGF (9C) em comparação ao ABG do mesmo grupo (8IN, 27C). O grupo tratado com TNP470 apresentou 2 padrões de marcação de VEGF para o AGI: 1) 9C e 2) 3C, indicando manutenção da marcação de VEGF em alguns animais e modesta redução em outros, em comparação ao grupo MNU. A associação dos fármacos aumentou as marcações intranuclear e citoplasmática (1IN, 27C) de VEGF no AGI em comparação ao grupo MNU (Tabela 23, figura 28).

O AAG e o AGI do grupo MNU apresentaram o mesmo padrão de marcação de VEGF (9C), entretanto o AAG apresentou redução deste fator em comparação ao ABG (8IN, 9C). O tratamento com TNP470 reduziu a marcação citoplasmática de VEGF (3C) no AAG em comparação ao grupo MNU (Tabela 23, figura 28).

Endostatina

As regiões de epitélio normal do grupo MNU apresentaram dois padrões de endostatina: 1) 9C e 2) 3C, indicando redução da marcação supranuclear e aumento da citoplasmática em comparação às mesmas regiões do grupo controle (3SN). O epitélio normal do grupo tratado com PMAPA ou com TNP470 apresentou aumento da marcação supranuclear e manutenção da citoplasmática (9SN, 3C) em comparação ao do grupo MNU (9C, 3C). O grupo tratado com PMAPA+TNP470 (9C) apresentou o mesmo padrão de marcação de endostatina que o grupo MNU (Tabela 20). Com relação aos componentes estromais, houve aumento na frequência de marcação de endostatina no endotélio (100%) e nas fibras de músculo liso (60%) do grupo MNU em comparação ao grupo controle (60% e 0%, respectivamente). O tratamento com PMAPA aumentou significativamente a frequência de marcação de endostatina nas células inflamatórias (80%) em comparação ao grupo MNU (40%). O tratamento com TNP470 pouco alterou o padrão de marcação dos componentes estromais em comparação ao grupo MNU. A associação de TNP470 e PMAPA aumentou a frequência de marcação de endostatina nas células inflamatórias (100%) em comparação ao grupo MNU (40%) (Tabela 21).

As lesões do tipo PIN do grupo MNU apresentaram 2 padrões de marcação de endostatina: 1) 9SN, 3C e 2) 27SN, 3C, indicando aumento da marcação supranuclear em comparação às regiões de epitélio normal do mesmo grupo. O tratamento com PMAPA ou

com TNP470 reduziu a marcação supranuclear de endostatina e aumentou a citoplasmática (0SN, 9C) em comparação ao grupo MNU. O tratamento com ambos os fármacos reduziu a marcação supranuclear e manteve a citoplasmática (0SN, 3C) em comparação ao grupo MNU (Tabela 24, figura 29).

As lesões do tipo PIA do grupo MNU apresentaram redução da marcação citoplasmática de endostatina (3C) em comparação às regiões de epitélio normal do mesmo grupo (9C). O tratamento com PMAPA aumentou a marcação intranuclear e citoplasmática (4IN, 9C) de endostatina na PIA em comparação ao grupo MNU (3C). O tratamento com TNP470 não alterou a marcação de endostatina (3C) em comparação ao grupo MNU (Tabela 24, figura 29).

As regiões de AP do grupo tratado com PMAPA apresentaram 2 padrões de marcação de endostatina: 1) 9C e 2) 3C. As regiões de AP do grupo tratado com TNP470 apresentaram fraca marcação citoplasmática (3C) de endostatina, enquanto aquelas do grupo tratado com a associação dos fármacos apresentaram intensa marcação citoplasmática (27C) (Tabela 24, figura 29).

Houve redução da marcação supranuclear de endostatina no ABG do grupo MNU (1SN, 3C) em comparação a PIN do mesmo grupo. O ABG do grupo tratado apenas com PMAPA apresentou aumento das marcações intranuclear e citoplasmática de endostatina (4IN, 9C) em comparação ao grupo MNU. O tratamento com TNP470 também aumentou as marcações intranuclear e citoplasmática de endostatina no ABG (4IN, 9C) em comparação ao grupo MNU. A combinação dos fármacos aumentou a marcação citoplasmática (27C) de endostatina no ABG em comparação ao grupo MNU (Tabela 24, figura 30).

O AGI do grupo MNU apresentou 3 padrões de marcação para a endostatina: 1) 4SN, 3C; 2) 27SN, 3C e 3) 27SN, 9C. O tratamento com TNP470 reduziu a marcação de endostatina (3C) no AGI em relação ao grupo MNU. O tratamento com a associação dos fármacos reduziu a marcação supranuclear e aumentou a marcação citoplasmática de endostatina (0SN, 9C) em comparação ao grupo MNU (Tabela 24, figura 30).

O AAG do grupo MNU apresentou redução da marcação supranuclear de endostatina (0SN) em comparação ao ABG do mesmo grupo. O tratamento com TNP470 aumentou a marcação citoplasmática de endostatina no AAG (9C) em comparação ao grupo MNU (3C) (Tabela 24, figura 30).

4.4 Western Blotting

4.4.1 Fatores indutores e reparadores de lesão tecidual

TLR4

Houve aumento significativo dos níveis de TLR4 no grupo MNU em comparação ao grupo controle ($p \leq 0,01$). Os grupos que receberam PMAPA e TNP470, isoladamente ou em associação, apresentaram níveis proteicos de TLR4 semelhantes ao grupo MNU (Figura 31).

NFκB

Houve aumento significativo dos níveis proteicos de NFκB no grupo MNU em comparação ao grupo controle ($p \leq 0,05$). Os grupos que receberam PMAPA e TNP470, isolado ou em associação, apresentaram níveis proteicos de NFκB semelhantes ao grupo MNU (Figura 31).

TNFα

Houve aumento significativo dos níveis proteicos de TNFα no grupo MNU em comparação ao grupo controle ($p \leq 0,01$). Houve redução significativa dos níveis de TNFα no grupo MNU+PMAPA em comparação ao grupo MNU ($p \leq 0,01$) e estes níveis foram semelhantes ao grupo controle. O grupo MNU+TNP470 não apresentou alteração significativa dos níveis de TNFα em comparação ao grupo MNU. A associação dos tratamentos reduziu os níveis de TNFα em comparação ao grupo MNU ($p \leq 0,01$) (Figura 31).

IL6

Houve aumento significativo dos níveis proteicos de IL6 no grupo MNU em comparação ao grupo controle ($p \leq 0,01$). O grupo MNU+PMAPA apresentou maiores níveis de IL6 em comparação ao grupo MNU ($p \leq 0,05$) e ao grupo controle ($p \leq 0,01$). O grupo MNU+TNP470 apresentou menores níveis de IL6 em comparação ao grupo MNU ($p \leq 0,01$), assim como o grupo que recebeu a associação dos fármacos ($p \leq 0,01$) (Figura 31).

4.4.2 Receptores hormonais

AR

Houve aumento significativo dos níveis proteicos de AR nos grupos MNU e MNU+PMAPA em comparação ao grupo controle ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,01$, respectivamente). Houve redução significativa dos níveis proteicos de AR nos grupos MNU+TNP470, MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA em comparação ao grupo MNU ($p \leq 0,01$), (Figura 32).

ER α

Não houve diferença significativa dos níveis proteicos de ER α entre os grupos MNU e MNU+TNP470 em comparação ao grupo controle. Não observamos alteração dos níveis proteicos de ER α nos grupos MNU+TNP470, MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA em comparação ao grupo MNU. Adicionalmente, houve aumento dos níveis proteicos de ER α nos grupos MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$), (Figura 32).

ER β

Não houve alteração significativa entre os grupos (Figura 32).

4.4.3 Enzimas antioxidantes e os radicais livres

Catalase

Houve aumento significativo dos níveis proteicos de Catalase no grupo MNU em comparação ao grupo controle ($p \leq 0,01$). Houve redução significativa dos níveis de Catalase no grupo MNU+TNP470 em comparação ao grupo MNU ($p \leq 0,01$). Os grupos MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA não apresentaram diferença significativa dos níveis de Catalase em comparação ao grupo MNU (Figura 33).

GSH-Px1

Os grupos CT, MNU, MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA apresentaram níveis semelhantes de GSH-Px1. Houve aumento significativo dos níveis de GSH-Px1 no grupo MNU+TNP470 em comparação aos demais grupos ($p \leq 0,01$) (Figura 33).

NRF2

Houve aumento significativo dos níveis de NRF2 nos grupos MNU, MNU+TNP470, MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA em comparação ao grupo CT ($p \leq 0,01$). Houve aumento significativo dos níveis de NRF2 no grupo MNU+PMAPA em comparação ao grupo MNU ($p \leq 0,05$). Não houve diferença significativa nos níveis de NRF2 dos grupos MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA em relação ao grupo MNU (Figura 33).

NOX4

Houve aumento de NOX4 nos grupos MNU, MNU+TNP470, MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA em comparação ao grupo CT ($p \leq 0,01$). Houve redução dos níveis de NOX4 nos grupos MNU+TNP470, MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA em

comparação ao grupo MNU ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$, respectivamente). Adicionalmente, os níveis proteicos de NOX4 dos grupos MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA foram semelhantes aos do grupo MNU+TNP470 (Figura 33).

4.4.4 Fatores reguladores da angiogênese

HIF1 α

Os grupos CT, MNU, MNU+TNP470 e MNU+PMAPA apresentaram níveis de HIF1 α semelhantes entre si. Houve aumento significativo dos níveis proteicos de HIF1 α no grupo MNU+TNP470+PMAPA em comparação aos demais grupos. ($p \leq 0,01$), (Figura 34).

VEGF

Não houve alteração significativa dos níveis proteicos de VEGF entre os grupos analisados (Figura 34).

Endostatina

Os grupos CT, MNU, MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA apresentaram níveis proteicos de endostatina semelhantes. Houve aumento significativo de endostatina no grupo MNU+TNP470 em comparação aos demais grupos ($p \leq 0,01$), (Figura 34).

5. DISCUSSÃO

5.1 Método de indução e validação do modelo animal.

O câncer de próstata (CP) é a doença mais comum do trato urogenital (Schweizer & Drake, 2014) e diversas técnicas de indução química da carcinogênese prostática em roedores tem sido utilizadas com o intuito de desenvolver um modelo animal que permita estudar, em curto período de tempo, as etapas da carcinogênese, desde os estágios primordiais até a doença metastática (Bosland et al., 1990; Schleicher et al., 1996; Gonçalves et al., 2013). Diversas linhagens de roedores, como Wistar, Sprague-Dawley, Lobund-Wistar, Fischer 344 e gerbilos da espécie *Meriones unguiculatus* já foram testadas e o grande período de latência e baixa taxa de incidência dos tumores são obstáculos a serem contornados (Pollard & Luckert, 1987; Gonçalves et al., 2010; Gonçalves et al., 2013; Bosland et al., 1990; Schleicher et al., 1996).

Nossos resultados demonstram que a administração intraprostática do carcinógeno *N*-metil-*N*-nitrosouréia (MNU), acompanhada do tratamento com cipionato de testosterona para promover a mitose das células neoplásicas e formação dos tumores, foram capazes de induzir lesões prostáticas pré-malignas e malignas (adenocarcinoma prostático) em animais da linhagem Fisher 344. Baseamos nossa técnica de indução química da carcinogênese em estudos anteriores realizados por Bosland et al. (1990) e adaptados por Schleicher et al. (1996); entretanto realizamos duas modificações importantes: não induzimos o estado quiescente da próstata com flutamida (bloqueador de receptor de andrógeno) antes da exposição ao carcinógeno e administramos duas doses do mesmo e obtivemos uma maior incidência de tumores (100%). Assim, o bloqueio dos receptores de andrógeno com flutamida parece ser menos importante do que a administração da segunda dose do carcinógeno para aumentar a eficácia do método de indução. O aumento de peso visto no lobo ventral prostático dos animais do grupo CP é compreensível, visto as propriedades mitogênicas derivadas da ativação dos receptores de andrógeno pela testosterona (Grossmann et al., 2013; Glina et al., 2010).

Outra importante diferença técnica de nosso trabalho diz respeito à via utilizada para administração do cipionato de testosterona. Schleicher et al. (1996) instalaram implantes subcutâneos de testosterona no dorso dos animais sob anestesia e estes eram substituídos a cada 6 semanas; e relataram perda de 10% dos animais devido a complicações cirúrgicas e com a anestesia, uma vez que os animais ficaram susceptíveis a overdose por anestésico após exposição ao MNU. Em nosso método de indução, não houve perda de animais, pois ainda

que a administração subcutânea de testosterona cause estresse aos animais, ela é menos nociva que sucessivas anestésias para instalação dos implantes subcutâneos.

Com relação ao período de latência dos tumores, nosso método de indução da carcinogênese foi capaz de desenvolver adenocarcinoma prostático em apenas 20 semanas após a primeira exposição ao carcinógeno, contra 56 (Pollard et al., 1995) e 67 semanas (Schleicher et al., 1996) de trabalhos anteriores. Assim, nossa técnica de indução química da carcinogênese prostática aumentou a incidência do adenocarcinoma prostático (100%) e reduziu significativamente o período de latência dos tumores (20 semanas).

De acordo com a teoria mais aceita recentemente, o CP se desenvolve a partir da atrofia inflamatória proliferativa (PIA), uma condição pré-maligna, caracterizada pelo aumento da proliferação das células epiteliais, com a presença de grandes infiltrados inflamatórios. Nesta condição, as células epiteliais altamente proliferativas da PIA começam a perder a estrutura colunar e passam a exibir células de formato cuboide e os ácinos começam a perder suas invaginações características. Evidências sugerem que a PIA possa ser precursora da neoplasia intraepitelial prostática (PIN) (Nelson et al., 2004). A PIN também é uma condição pré-maligna, caracterizada por células de formato variado e aumento do núcleo das células dos ductos e ácinos. A PIN origina então, o CP *in situ*, caracterizado principalmente pela perda da camada de células basais e da arquitetura normal da glândula. Sendo assim, a constatação da ocorrência simultânea de lesões pré-malignas e malignas é considerada um fator importante em modelos animais para estudo da carcinogênese prostática (Bostwick et al., 2004; Shappell et al., 2004). Nossos resultados histopatológicos demonstraram que nosso método de indução química da carcinogênese prostática foi eficaz na promoção de lesões pré-malignas (HGPI e PIA) e malignas (adenocarcinoma de graus baixo, intermediário e alto) (Tabela 1) em animais da linhagem Fischer 344, tornando-o um modelo adequado para ensaios de eficácia e toxicidade de novas perspectivas terapêuticas contra o CP e capaz de auxiliar na priorização de intervenções para futuros estudos translacionais.

5.2 Histopatologia

Estudos anteriores demonstraram a atividade antitumoral do PMAPA em câncer de bexiga não-músculo invasivo (CBNMI) (Fávaro et al., 2012; Garcia et al., 2015). Nossos dados de histopatologia demonstraram que o tratamento com PMAPA reduziu significativamente a frequência de animais com PIA (20%), com AGI (0%) e com AAG (0%) e pouco reduziu a frequência de HGPI (60%) em comparação ao grupo MNU. Assim,

concluímos que o PMAPA foi eficaz contra a PIA e exibiu significante atividade antitumoral contra o AGI e o AAG.

Estudos anteriores demonstraram que o TNP470 e a fumagilina são capazes de inibir a metástase e o crescimento tumoral em câncer de fígado e de cólon, respectivamente (Gervaz et al., 2000; Hou et al., 2009). Nossos dados demonstraram que o tratamento apenas com TNP470 pouco alterou as frequências de HGPIN (60%), PIA (60%) e AGI (40%) e não alterou as frequências do ABG (20%) e do AAG (20%) em comparação ao grupo MNU. Portanto, concluímos que, em nosso modelo animal, o tratamento apenas com TNP470 foi menos eficaz contra as lesões prostáticas do que o tratamento apenas com PMAPA.

Recentemente, várias drogas antiangiogênicas visando o VEGF ou seus receptores foram aprovadas para o tratamento de diversos tipos de canceres. No entanto, dados clínicos sugerem que os pacientes que apresentaram melhora da oxigenação e da perfusão tumoral em resposta a essas drogas, tem um melhor prognóstico. Assim, alternativas terapêuticas que controlem a hipóxia e melhorem a perfusão tumoral podem aumentar a eficácia da quimio e da imunoterapia (Jain, 2014). Nesse sentido, esperávamos que o grupo tratado com PMAPA e com TNP470, um antiangiogênico análogo da Fumagilina, apresentasse melhor recuperação histopatológica do que aquela obtida no grupo tratado apenas com PMAPA ou com TNP470. Surpreendentemente, a associação dos fármacos reduziu a frequência de animais com HGPIN (40%), PIA (0%) e AAG (0%), mas pouco reduziu a frequência de animais com AGI (40%) e aumentou a de animais com ABG (40%) em comparação ao grupo de animais não tratados. Portanto, o único aparente sinergismo verificado com a associação dos tratamentos foi contra as lesões pré-malignas do tipo PIA e HGPIN; no que diz respeito ao adenocarcinoma, a combinação do PMAPA e do TNP470 se mostrou uma alternativa terapêutica melhor do que o tratamento apenas com TNP470, porém foi menos eficaz em comparação à administração apenas do PMAPA.

5.3 Efeitos do PMAPA e do TNP470 sobre os fatores indutores e reparadores de lesão tecidual.

O papel dos TLRs no câncer é controverso, pois vários estudos demonstraram que os TLRs podem atuar como reguladores positivos ou negativos da carcinogênese (Galli et al., 2010; Matijevic & Pavelic, 2010). Alguns autores demonstraram que os TLRs podem ajudar as células tumorais a escaparem do sistema imune (Huang et al., 2005); outros mostraram que a expressão dos TLRs pelas células tumorais pode direcioná-las a apoptose ou outro tipo de morte celular (Salaun et al., 2007; Galli et al., 2010). Assim, o

papel, aparentemente, contraditório dos TLRs pode ser esclarecido pela natureza e intensidade da resposta inflamatória deflagrada (Galli et al., 2010). Normalmente, a inflamação associada ao câncer é semelhante à inflamação crônica, incluindo a produção de fatores estimuladores do reparo tecidual e da sobrevivência e proliferação de células cancerosas (Galli et al., 2010). No entanto, caso a resposta inflamatória seja aguda, um mecanismo efetor imunológico é ativado e o tumor regride (Galli et al., 2010). Assim, compostos que atuam como agonistas dos TLRs são alvo de intensa investigação para o tratamento do câncer. Um estudo realizado por Fávaro e colaboradores (2012) demonstrou a capacidade do PMAPA de ativar os receptores TLR2 e 4.

De acordo com Quinta e colaboradores (2006), a próstata é o órgão do trato genital masculino com maior propensão à inflamação, entretanto há pouca informação sobre a imunobiologia da glândula. Ainda, o TLR4 é o maior sensor de sinais nocivos e o gatilho principal da resposta imune inata. Segundo estes autores, o lobo ventral da próstata de ratos Wistar apresenta expressão constitutiva de TLR4 nas células epiteliais e há aumento dos níveis deste receptor nas fibras musculares hipertróficas após a castração dos animais (Quinta et al., 2006). Utilizando um modelo animal de prostatite, o mesmo estudo demonstrou aumento do conteúdo citoplasmático de TLR4, demonstrando que a próstata é capaz de reconhecer patógenos e iniciar a resposta imune. De acordo com nossos dados, ratos da linhagem Fischer 344 também apresentaram ativação constitutiva de TLR4, de NFkB, de TNF α e de IL6; e a exposição ao carcinógeno elevou a marcação citoplasmática destas proteínas no epitélio normal em relação ao controle, demonstrando a capacidade da próstata de realizar uma resposta imune contra um agente inflamatório.

A comparação entre as regiões de epitélio normal dos diferentes grupos nos mostra como os diferentes tratamentos interferem no microambiente da glândula e muitas vezes alteram o padrão de resposta inflamatória local, mesmo na ausência de lesões epiteliais. O tratamento com PMAPA manteve os níveis citoplasmáticos epiteliais e elevou os níveis estromais de TLR4, aumentou os níveis intranucleares epiteliais de NFkB e reduziu os níveis citoplasmáticos epiteliais de TNF α e IL6 em comparação ao grupo MNU; além de elevar a marcação estromal de TNF α . Esses dados demonstram que o PMAPA também é capaz de ativar a via dos receptores tipo *toll* na próstata, além da bexiga, como relatado anteriormente (Favaro et al., 2012). Ainda, o aumento da marcação estromal para TLR4 e TNF α demonstra a mudança do microambiente tumoral provocada pelo PMAPA, mesmo diante de um agente

carcinogênico, ilustrando a dependência do epitélio em relação aos sinais recebidos do estroma (Cunha et al., 2002).

O tratamento com TNP470 reduziu a marcação citoplasmática de TLR4, aumentou a marcação intranuclear de NFkB em 40% dos animais, reduziu a marcação citoplasmática de TNF α e aumentou a marcação intranuclear de IL6 em comparação ao grupo MNU. No entanto, não verificamos alteração no compartimento estromal. Essas alterações em conjunto demonstram que o perfil da resposta inflamatória após o tratamento com TNP470 foi diferente da resposta inflamatória induzida pelo PMAPA e justifica, em partes, a ineficácia do TNP470 em conter a progressão tumoral em comparação ao PMAPA.

A associação dos fármacos pouco alterou a marcação de TLR4 e NFkB em comparação ao MNU, embora tenha reduzido a marcação citoplasmática de TNF α e induzido a marcação intranuclear de IL6, sem promover grandes alterações na intensidade de marcação do compartimento estromal.

As lesões do tipo neoplasia intraepitelial prostática (PIN) do grupo MNU apresentaram redução da marcação citoplasmática de TLR4, aumento dos níveis intranucleares e citoplasmáticos de NFkB, aumento da marcação de TNF α e manutenção da marcação citoplasmática de IL6 em comparação as regiões de epitélio normal do mesmo grupo. Esses dados demonstram que a redução citoplasmática de TLR4, o aumento nuclear de NFkB e TNF α foram necessários para a proliferação epitelial. De acordo com a histopatologia, o grupo tratado com TNP470+PMAPA apresentou a menor frequência de PIN e nossos dados sugerem que este efeito tenha ocorrido, pois a associação dos fármacos parece ter revertido as modificações que ocorreram para o desenvolvimento desta lesão, deixando o padrão de marcação destas lesões muito parecido com padrão de marcação epitelial do grupo controle. Portanto, no que diz respeito ao padrão de resposta inflamatória contra lesões do tipo PIN, a associação dos fármacos foi a melhor abordagem terapêutica, reduzindo em 50% a frequência destas lesões.

As lesões do tipo atrofia inflamatória proliferativa (PIA) do grupo MNU apresentaram redução da marcação citoplasmática de TLR4, manutenção da marcação de NFkB, presença de modesta marcação intranuclear de TNF α e moderada marcação intranuclear de IL6 em comparação às regiões de epitélio normal do mesmo grupo. De acordo com a histopatologia, a associação dos fármacos foi a melhor abordagem terapêutica contra este tipo de lesão, seguida pelo tratamento apenas com PMAPA. De modo geral, os grupos tratados com TNP470 e PMAPA isolados, apresentaram padrões semelhantes de marcação da via inflamatória, com

redução de marcação intranuclear de NFkB, TNF α e IL6. Assim, somente contra lesões do tipo PIA, a associação dos fármacos parece ter tido um efeito sinérgico, pois culminou com o completo desaparecimento destas lesões após o tratamento.

Com relação à atrofia prostática nos grupos tratados, todos eles apresentaram padrões semelhantes de marcação para os componentes da via do TLR4, com padrões parecidos com as regiões de epitélio normal do grupo controle e do grupo MNU. Esses padrões associados aos padrões de marcação de AR, ER α e ER β ilustram o estado quiescente do epitélio.

Em relação ao adenocarcinoma de baixo grau (ABG) do grupo MNU, notamos um padrão de marcação da via do *toll* muito semelhante às lesões do tipo PIA. Segundo Putzi & De Marzo (2000), a lesão do tipo PIA pode representar uma condição precursora da PIN e/ou do câncer prostático e no que diz respeito ao perfil inflamatório, nossos dados condizem com esta afirmação. De acordo com a histopatologia, nenhum dos tratamentos foi totalmente eficaz contra o ABG, o que pode ser justificado, em partes, pela semelhança entre os perfis de resposta inflamatória para o ABG entre os grupos tratados e o grupo MNU.

O adenocarcinoma de grau intermediário do grupo MNU apresentou perfil inflamatório semelhante ao ABG do mesmo grupo, demonstrando que em nosso modelo, a progressão tumoral não foi acompanhada de um aumento da sinalização da via de TLR4. De acordo com a histopatologia, o tratamento com PMAPA foi a melhor abordagem contra o AGI, levando ao seu total desaparecimento. A associação do PMAPA com TNP470 não foi tão benéfica como o tratamento apenas com PMAPA, pois assim como o tratamento apenas com TNP470 não alterou o perfil inflamatório do AGI em comparação ao grupo MNU.

O adenocarcinoma de alto grau do grupo MNU apresentou padrões de marcação da via do *toll* semelhantes ao AGI do mesmo grupo. Segundo a histopatologia, o tratamento com PMAPA foi a melhor a abordagem contra o AAG, pois causou a regressão tumoral, mesmo em associação com o TNP470. A ineficácia do TNP470 pode ser explicada, em partes, por não ter alterado o perfil de resposta inflamatória do AAG em comparação ao grupo MNU.

De modo geral, os resultados de Western Blotting mascararam os diferentes efeitos dos tratamentos revelados pela imunohistoquímica. Entretanto, notamos maiores níveis proteicos de todos os componentes da via do TLR4 no grupo MNU em comparação ao grupo controle. O PMAPA manteve os níveis de TLR4 e NFkB semelhantes ao grupo MNU e reduziu os níveis de TNF α e aumentou os níveis de IL6, demonstrando que após o tratamento a via dos receptores *toll* se mantém ativa mas leva a um perfil diferente de resposta inflamatória que tende a ser mais aguda do que no grupo sem tratamento. O tratamento com

TNP470 manteve os níveis de TLR4, NFkB e TNF α semelhantes ao grupo MNU e reduziu os níveis de IL6. A associação dos fármacos manteve os níveis proteicos de TLR4 e NFkB semelhantes ao grupo MNU, mas reduziu os níveis proteicos de TNF α e IL6, sugerindo uma resposta inflamatória do tipo crônica.

Em resumo, notamos que os tratamentos com PMAPA e TNP470 atuam de modos diferentes sobre a resposta inflamatória em regiões do epitélio com e sem lesão e em regiões com lesões pré-neoplásicas e neoplásicas. Ainda, a associação dos fármacos é a melhor alternativa para o tratamento de lesões pré-neoplásicas (PIN e PIA), pois tende a restaurar o padrão de resposta inflamatória exibido pelo epitélio do grupo controle. O PMAPA, por sua vez, revelou-se a melhor abordagem contra o adenocarcinoma, pois reduziu significativamente a frequência do AGI e do AAG e pela análise do ABG, sugerimos que seu efeito se deva a estimulação de TLR4, com aumento de NFkB intranuclear e manutenção de altos níveis de TNF α e IL6, ilustrando um perfil característico de uma resposta inflamatória do tipo aguda.

5.4 Efeitos do PMAPA e do TNP470 sobre os receptores hormonais.

A atividade do AR é dirigida por um balanço entre a função de proteínas ativadoras (como p300, Tip-60 e proteínas ativadoras de AR (ARA)) e de proteínas repressoras de AR (como NCoR, Smad e histonas desacetilases (Sirt-1)) (Shang et al., 2002; Fu et al., 2006). A hiperativação do AR é o deflagrador fundamental da progressão do câncer (Chen et al., 2004) e estudos recentes suportam a hipótese de que as vias de sinalização do AR desempenham um papel importante no desenvolvimento e progressão de alguns cânceres, explicando algumas das diferenças entre os tumores masculinos e femininos (Hetge et al., 1990; Siegel et al., 2012; Li et al., 2012; Garcia et al., 2015).

Os estrógenos também são hormônios sexuais que atuam sinergicamente à testosterona, influenciando tanto as funções prostáticas normais e como as alterações patológicas (Weihua et al., 2001; Cunha et al., 2002) e exercem suas funções através do receptores a e b (Risbridger et al., 2001; Cunha et al., 2002). Camundongos knockout para ER β (BERKO) apresentaram focos de hiperplasia epitelial no lobo ventral da próstata aos 5 meses de idade, afirmando a capacidade antiproliferativa do ER β (Weihua et al., 2002). No entanto, aqueles animais não desenvolvem câncer de próstata (Imamov et al., 2004b), levando alguns autores a propor que a perda de ER β ocorra como consequência da tumorigênese causada por outros mecanismos oncogênicos, como deleção da PTEN que por sua vez induz BMI-1, um repressor da transcrição de ER β (Mak et al., 2015). Concomitantemente, a

repressão de ER β contribui para a tumorigênese porque favorece a sinalização HIF1/VEGF o que sustenta a expressão de BMI-1 por uma alça de retroalimentação positiva (Mak et al., 2015).

Em resumo, notamos que o aumento da agressividade tumoral em nosso modelo não foi acompanhado pelo aumento da expressão dos receptores de andrógeno, uma vez que tumores de diferentes graus apresentaram padrões de marcação idênticos. Entretanto, o aumento de AR intranuclear parece acompanhar o aparecimento de lesões do tipo PIN, mas deixa de existir no adenocarcinoma. Ainda que o Western Blotting não discrimine os efeitos dos tratamentos nas diferentes lesões, notamos o aumento dos níveis proteicos de AR nos animais tratado com MNU em comparação ao grupo controle (figura 26), demonstrando a importância do aumento da expressão de AR para a carcinogênese. Adicionalmente, verificamos que o tratamento com PMAPA e com o TNP470, isolados ou em conjunto, reduziram significativamente os níveis proteicos de AR em comparação aos animais que não receberam tratamento. Nossos dados de imunohistoquímica e Western Blotting estão de acordo com Kido e colaboradores (2014) que relataram redução significativa dos níveis proteicos e da imunomarcação de AR após tratamento com inibidores direto e indireto da angiogênese (TNP470 e SU5416). A redução dos níveis de AR após tratamento com PMAPA, por sua vez, pode ser explicada em partes pela ativação de NCoR e de DACH-1. Estudos anteriores demonstraram que o PMAPA é capaz de reduzir os níveis de AR aumentando os níveis de seu repressor NCoR (Garcia et al., 2015) e de acordo com Wu et al (2009) a ligação de DACH-1 a NCoR reduz a atividade do receptor de andrógeno. Adicionalmente, ainda que a administração do TNP470 isolado ou em conjunto com o MAPA tenha reduzido os níveis de AR para valores ainda menores do que aqueles observados após o tratamento apenas com PMAPA, houve uma melhor recuperação histopatológica do grupo tratado apenas com PMAPA. Esses dados sugerem que o tratamento de lesões pré-neoplásicas e do adenocarcinoma não se baseia apenas no controle do AR e que as alterações na via da angiogênese e no padrão de resposta inflamatória através dos receptores tipo *toll* provocadas pelo PMAPA certamente se somam às alterações hormonais e contribuem para uma melhor recuperação histopatológica.

Com relação ao ER α , nossos dados nos permitem inferir que o aumento de ER α intranuclear no epitélio normal do grupo MNU contribua para criar um ambiente favorável ao aparecimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas em nosso modelo de carcinogênese e ainda que o tratamento com PMAPA isolado modificou o epitélio normal, tornando-o menos

propenso à proliferação. De modo geral, confirmamos a capacidade proliferativa do ER α e ele foi importante para o desenvolvimento de lesões do tipo PIN e para a progressão tumoral do adenocarcinoma de baixo grau para o de grau intermediário em nosso modelo. A redução da marcação intranuclear de ER α no epitélio normal do grupo MNU+PMAPA em comparação ao grupo MNU auxilia a explicar a recuperação histopatológica observada neste grupo. No entanto, as alterações das marcações verificadas por imunohistoquímica não foram detectadas no Western Blotting, pois as diferentes alterações podem ter sido mascaradas pela técnica.

De modo geral, concluímos que a redução de ER β acompanhou as etapas iniciais da carcinogênese em nosso modelo, mas não foi observada na progressão tumoral. Ainda, esta variação só foi observada com a imunomarcação, pois não houve diferença significativa dos níveis proteicos de ER β no Western Blotting. Adicionalmente, notamos que o TNP470 reduz a marcação intranuclear de ER β no epitélio normal e em lesões pré-neoplásicas do tipo PIN estando de acordo com os resultados anteriores (Kido et al., 2014), mas deixa de ter este efeito em lesões neoplásicas, provavelmente por diminuir a produção de VEGFa, um importante ativador de BMI-1 que bloqueia ER β e favorece a carcinogênese (Mak et al., 2015).

5.5 Efeitos do PMAPA e do TNP470 sobre as enzimas antioxidantes e os radicais livres.

Battisti e colaboradores (2011) correlacionaram o grau (Gleason) e o estágio do CP com as atividades das enzimas SOD, CAT e GSH-Px1 e concluíram que a diminuição dos níveis séricos destas enzimas antioxidantes é considerado um importante fator de desenvolvimento e progressão tumoral. Além dos andrógenos e estrógenos, o fator de transcrição eritróide 2p45 (NF-E2) relacionado ao fator 2 (NRF2) ativa vias citoprotetoras em resposta ao EO, à inflamação e à apoptose, induzindo a expressão de enzimas antioxidantes e de detoxificação. Em condições normais, a atividade do NRF2 é negativamente regulada pela Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) que se associa ao fator e encaminha-o para a degradação proteossômica (Kensler et al., 2007). Entretanto, na presença de EO, KEAP-1 se dissocia do complexo e o NRF2 é estabilizado e ativado e sua nova função é aproveitada pelas células cancerosas em benefício próprio (Shibata et al., 2008). Estudos demonstraram que o NRF2 e vários dos seus genes alvo foram significativamente infrarregulados no CP e como resultado, as células prostáticas foram expostas continuamente ao EO, com consequente progressão para a doença metastática (Baker et al., 1997; Khandrika et al., 2009). Entretanto, há relatos de que a ativação constitutiva de NRF2 promove a sobrevivência das células cancerosas e confere resistência a quimio e radioterapias (Lau et al., 2008). Recentemente,

Singh e colaboradores (2016) descobriram que a ativação constitutiva de NRF2 diminui miR-1 e miR-206, direcionando o fluxo de carbono para a via da pentose fosfato e para o ciclo do ácido tri-carboxílico, reprogramando o metabolismo da glicose e favorecendo o crescimento tumoral.

Comparando as regiões de epitélio normal do grupo MNU e do controle, notamos redução da marcação intranuclear de NRF2, manutenção da marcação citoplasmática das enzimas Catalase e GSH-Px1 e redução ou manutenção dos níveis intranucleares de NOX4 após exposição ao carcinógeno e a testosterona. Satoh e colaboradores (2013) compararam camundongos knockouts para NRF2 com camundongos selvagens e relataram que a ativação transitória de NRF2 pode ser benéfica enquanto a ativação persistente pode ser nociva. Deste modo, a ativação de um fator de transcrição é uma “faca de dois gumes”, em que níveis extremamente baixos ou altos de NRF2 aumentam o risco de doenças (Kensler et al., 2010). De acordo com este paradigma, a deleção de NRF2 aumenta a susceptibilidade a carcinógenos e infecções bacterianas e virais, enquanto a superexpressão dele promove resistência a drogas e proliferação das células cancerosas (Kensler et al., 2010). Portanto, a prevenção efetiva ocorre dentro do limite entre a dose efetiva biológica e a máxima dose tolerada pelo organismo. Segundo Wang e colaboradores (2012), alguns indutores químicos têm um efeito transitório na ativação da via do NRF2 e outros, como o arsênio, apresentam efeito prolongado. Assim, a redução de NRF2 em regiões de epitélio normal do grupo MNU em comparação ao controle pode ser explicada como um mecanismo de defesa frente ao microambiente nocivo criado pelo carcinógeno e testosterona, pois o NRF2 pode bloquear ou retardar a carcinogênese em células normais ou pré-malignas, mas pode se tornar indesejável quando os mecanismos de defesa estão sob controle de células malignas (Satoh et al., 2013). Ainda, verificamos a manutenção dos níveis de NRF2 em lesões pré-malignas (PIA e PIN) e sua redução conforme a progressão da carcinogênese que culminou com um tumor de alto grau, mas não-resistente a terapia antitumoral. Adicionalmente, nossos dados de Western Blotting demonstraram que todos os grupos tratados com MNU apresentaram maiores níveis proteicos de NRF2 em comparação ao grupo controle, sendo que os níveis mais altos foram apresentado pelo grupo MNU+PMAPA. Deste modo, futuros estudos avaliando os efeitos do PMAPA e do TNP470 sobre os miR-1 e miR-206 seriam necessários para o melhor entendimento dos efeitos histopatológicos observados após o tratamento e sua relação com o NRF2.

Enzimas do tipo NOX representam a maior fonte não-mitocondrial de EROs e a sua superexpressão leva a produção de peróxido de hidrogênio e a senescência celular, bem como

a resistência a apoptose e a aquisição de fenótipo tumorigênico, o qual pode ser inibido pela Catalase (Lambeth, 2004; Graham et al., 2010). Estudos anteriores demonstraram a superexpressão de NOX4 em carcinomas de mama, próstata e ovário (Graham et al., 2010). Em nosso modelo de indução, houve aumento expressivo de NOX4 no núcleo de lesões pré-neoplásicas (PIA e PIN), mas este aumento não acompanhou a progressão tumoral. Estudos anteriores relataram que a administração crônica de dihidrotestosterona em ratos induziu a expressão de citocinas inflamatórias na próstata (Harris et al., 2000) e que este infiltrado inflamatório seria a principal fonte de EROS, ocasionando lesões oxidativas no epitélio que seriam a causa da formação das lesões do tipo PIA. Estas lesões formariam a base para a proliferação celular aumentada, levando ao aparecimento da PIN e progressivamente, ao câncer (Ho et al., 2004). Assim, o aumento de NOX4 na PIA e na PIN (provavelmente, agravado pela exposição contínua à testosterona no período de indução) está de acordo com a literatura e demonstra que a instalação de um quadro de injúria oxidativa no epitélio foi necessária para o início da carcinogênese, mas não acompanhou a sua progressão até o AAG. Ainda, sugerimos que os baixos níveis de NOX4 no AAG indique que o mecanismo de apoptose não foi prejudicado, pois segundo Graham e colaboradores (2010), a superexpressão de NOX4 pode levar a resistência a apoptose. Nossos dados de Western Blotting também demonstraram que os grupos tratados com MNU apresentaram maiores níveis proteicos de NOX4 que o grupo controle e de modo geral, os tratamentos foram capazes de reduzi-los de maneira significativa.

Catalase e GSH-Px1 são importantes enzimas antioxidantes que contribuem para a redução dos níveis de H_2O_2 e a redução dos níveis séricos dessas enzimas foi considerada um importante fator no desenvolvimento e na progressão tumoral (Battisti et al., 2011). Curiosamente, as lesões do tipo PIN e PIA do grupo MNU apresentaram aumento da marcação intranuclear de Catalase e GSH-Px1 e redução da marcação citoplasmática, sugerindo prejuízo do sistema antioxidante. Adicionalmente, verificamos que a progressão tumoral em nosso modelo foi acompanhada pela redução da marcação citoplasmática dessas enzimas, que culminou com a total ausência de marcação da Catalase no AAG do grupo MNU. Os resultados de Western Blotting para a GSH-Px1, de modo geral, foram os mesmos da imunohistoquímica. Os grupos controle, MNU, MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA apresentaram níveis proteicos semelhantes de GSH-Px1 que por sua vez, foram menores que o do grupo MNU+TNP470. Já com relação a Catalase, os grupos MNU, MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA apresentaram níveis semelhantes desta proteína, que por sua vez, foram maiores que os do grupo controle e MNU+TNP470.

De acordo com a histopatologia, a associação do TNP470 com PMAPA foi a melhor abordagem terapêutica contra lesões do tipo PIN. Nossos dados sugerem que este efeito pode ser atribuído à normalização do padrão de marcação citoplasmática da GSH-Px1 e à redução da marcação intranuclear de NOX4.

Considerando as lesões do tipo PIA, a associação dos fármacos também foi extremamente benéfica, seguida pelo tratamento apenas com PMAPA que nos dá um pista do que pode ter ocorrido. Nossos dados sugerem que a redução das lesões do tipo PIA se deva a redução da marcação intranuclear da Catalase e da GSH-Px1, aumento dos níveis citoplasmáticos da GSH-Px1 e redução da marcação de NRF2 e NOX4.

Com relação ao adenocarcinoma, o PMAPA foi a melhor abordagem terapêutica, pois reduziu a frequência do AGI e do AAG sem aumentar a frequência do ABG, sugerindo que ele também é eficaz em conter a progressão tumoral, ainda que o ABG presente no grupo que recebeu PMAPA apresente níveis de NOX4, NRF2, GSH-Px1 e Catalase muito semelhantes ao ABG do grupo MNU.

5.6 Efeitos do PMAPA e do TNP470 sobre os fatores reguladores da angiogênese

Diversos modelos animais de várias linhagens de roedores foram desenvolvidos para o melhor entendimento das etapas da carcinogênese (Bosland et al., 1990, Scheleicher et al., 1996; Gonçalves et al., 2013). O camundongo TRAMP está entre os mais utilizados, pois desenvolve tumores que reproduzem muitas das características do CP humano, apresentando NIP aos 6 meses de idade e tumores primários entre 18 e 24 meses (Greenberg et al., 1995; Gingrich et al., 1999). Dois eventos distintos da angiogênese foram descritos durante a progressão tumoral do CP em camundongos TRAMP: o *switch* de início e o *switch* de progressão da angiogênese (Huss et al., 2001). O primeiro evento foi caracterizado pelo aumento dos níveis de expressão HIF1 α e VEGFR1 e recrutamento da vascularização intraepitelial em lesões PIN de alto grau. No segundo evento, há queda dos níveis de HIF1 α e VEGFR1, aumento de VEGF e VEGFR2 e aumento da densidade de micro vasos epiteliais em carcinomas pouco diferenciados (Huss et al., 2001).

Nas últimas décadas, vários trabalhos vem relacionando a hipóxia com angiogênese, inflamação, imunossupressão, hipersensibilidade androgênica, metástase e resistência apoptose, à quimio e imunoterapias (Marignol et al., 2008; Jain, 2014). Os níveis de hipóxia regulam diretamente o HIF1 α que se encontra superexpresso em carcinoma prostático humano primário e metastático (Zhong et al., 1999; Marignol et al., 2008). Neste trabalho,

demonstramos que o PMAPA possui um potente efeito antitumoral contra o CP e que sua associação com o TNP470 melhorou os resultados contra a PIA e PIN, mas prejudicou sua eficácia contra o adenocarcinoma. Por um lado, pode-se argumentar que a administração do PMAPA é uma “faca de dois gumes” devido ao significativo aumento na frequência de HNP (Tabela 2). Por outro lado, acreditamos que a HNP seja um efeito colateral mais fácil de se controlar diante das alternativas terapêuticas contra o CP que normalmente levam a prostatectomia, quimioterapia e imunossupressão.

Recentemente, estudos sugeriram que a melhora da perfusão tumoral aliada com a atenuação da hipóxia poderiam melhorar a resposta à quimio e imunoterapias, uma vez que a hipóxia e o microambiente ambiente ácido reprogramam os macrófagos residentes para um fenótipo pró-tumorigênico e imunossupressivo (Jain et al., 2014). Além disso, vários genes que controlam o crescimento, a sobrevivência e a invasão celular, como as vias RAS/RAF/MEK e PI3K/AKT/PKB, são induzidos pela hipóxia direta ou indiretamente (Eliceirio et al., 1999; Alvarez-Tejado et al., 2001). Nossos dados demonstraram que a progressão tumoral em nosso modelo foi acompanhada pelo aumento progressivo de HIF1 α de lesões pré-neoplásicas até o AGI e que a expressão de VEGF parece sofrer aumento no adenocarcinoma de baixo grau, tendo comportamento semelhante ao switch de progressão da angiogênese apresentado pelo camundongo TRAMP aos 18 meses (Huss et al., 2001). Ainda, notamos redução de endostatina no ABG em comparação a PIN, estando de acordo com Montico e colaboradores (2015) que relataram redução de endostatina durante a progressão tumoral no modelo TRAMP. Adicionalmente, nossos dados sugerem que o PMAPA tenha controlado a hipóxia, uma vez que reduziu a marcação de HIF1 α na PIN, na PIA, no ABG e no AGI (Tabela 22). Além disso, verificamos intenso infiltrado inflamatório no estroma dos animais tratados com PMAPA, o que nos leva a sugerir que a redução de HIF1 α e o aumento ou manutenção de VEGF, aliado a modificação do microambiente tumoral com aumento de interferon (Fávaro et al., 2012) tenha aumentado a perfusão tumoral e permitido o recrutamento de macrófagos não-tumorigênicos e células NK. Anteriormente, foi demonstrado que o PMAPA pode restaurar a p53 selvagem (Fávaro et al., 2012), reduzir Siah2 e estimular NCoR, reduzindo os níveis de AR (Garcia et al., 2015). Horii e colaboradores (2007) identificaram uma *crosstalk* entre AR e HIF1 α em células de CP. De acordo com eles, o promotor do gene do PSA humano possui uma região responsiva à hipóxia a qual pode facilitar a progressão tumoral através da cooperação entre HIF1 α e AR para aumentar o PSA (Liu et al., 2005). Além disso, a suprarregulação de COX-2 foi

correlacionada com a carcinogênese prostática (Fujita et al., 2002) e tem participação na resistência a hipóxia através da inibição da atividade da p53 (Liu et al., 2005). Assim, acreditamos que além da redução de HIF1 α , o efeito antitumoral do PMAPA possa ser explicado por dois outros motivos: a modulação de AR e a atividade da p53.

Nos últimos anos, várias drogas antiangiogênicas almejando o VEGF ou seus receptores foram aprovadas para o tratamento do câncer. Infelizmente, essas substâncias que almejam reduzir o aporte sanguíneo, acabam elevando ainda mais os níveis de hipóxia e favorecendo a progressão tumoral (Jain et al., 2014). Estudos anteriores demonstraram que a monoterapia com anticorpo anti-VEGF (Bevacizumab) falhou em promover a sobrevida de pacientes (Jain, 2005) e apenas conferiu benefícios quando combinada com quimioterapia (Robert et al., 2011; Tewari et al., 2014). De fato, nossos dados demonstraram que o tratamento apenas com TNP470 foi a pior estratégia terapêutica para o tratamento de lesões prostáticas, pois não reduziu a frequência de lesões malignas e pré-malignas (Tabela 2). Além disso, o tratamento com TNP470 reduziu VEGF na PIA, no ABG e no AAG e aumentou o HIF1 α no ABG e no AAG. Esses dados estão de acordo com Montico e colaboradores (2015) que relataram redução de VEGF em camundongos TRAMP de 18 meses após a administração de TNP470 e ainda, reproduzem os achados de estudos anteriores que previam aumento da hipóxia após a terapia antiangiogênica, favorecendo a carcinogênese e justificando assim, os resultados histopatológicos (Jain et al., 2014).

Na tentativa de obter um efeito coadjuvante, esperávamos que a associação dos fármacos fosse uma alternativa terapêutica promissora. Supreendentemente, a associação de PMAPA e TNP470 não foi eficaz contra o adenocarcinoma, mas erradicou a PIA e reduziu significativamente a frequência da PIN. Nossos dados de imunohistoquímica nos levam a sugerir que a ausência de HIF1 α , níveis intermediários de VEGF e baixos níveis de endostatina sejam nocivos para a PIN e para a PIA e justifiquem a redução na frequência dessas lesões após o tratamento combinado. Além disso, baixos níveis de HIF1 α , altos níveis de VEGF e níveis altos ou intermediários de endostatina parecem favorecer lesões malignas, justificando as maiores frequências de ABG e AGI no grupo tratado apenas com TNP470 do que no grupo tratado apenas com PMAPA, o qual apresentou níveis intermediários de VEGF, altos níveis de endostatina e ausência de HIF1 α .

6. CONCLUSÃO

Nosso método de indução química da carcinogênese prostática foi eficaz na promoção de lesões pré-malignas (HGPIN e PIA) e malignas (adenocarcinoma de graus baixo, intermediário e alto) em animais da linhagem Fischer 344, tornando-o um modelo adequado para ensaios de eficácia e toxicidade de novas perspectivas terapêuticas contra o CP.

De modo geral, a manutenção da via de sinalização de TLR4, associada ao aumento intranuclear de AR e ER α , com redução de ER β , aumento de NOX4, manutenção de NRF2, redução citoplasmática de Catalase e GSH-Px1 e aumento de HIF1 α , VEGF e endostatina caracterizam as lesões pré-neoplásicas do nosso modelo de carcinogênese. Durante a progressão da carcinogênese, não houve aumento de NOX4, de AR, da sinalização de TLR4, nem redução de ER β ; mas sim aumento de ER α , HIF1 α e VEGF e redução de NRF2 e das enzimas Catalase e GSH-Px1 e de endostatina, demonstrando o aumento do potencial proliferativo, o prejuízo do sistema antioxidante e o aumento da hipóxia e de fatores angiogênicos.

Os fármacos PMAPA e TNP470 atuaram de modos diferentes em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas e interferiram na via de sinalização do TLR4, nos receptores hormonais, na via do estresse oxidativo e da angiogênese.

A associação dos fármacos, seguida pelo tratamento apenas com PMAPA foram as melhores alternativas terapêuticas contra a PIA e sugerimos que seu efeito se deva a normalização da resposta inflamatória, a redução de AR citoplasmático, ao aumento dos níveis citoplasmáticos de GSH-Px1, a redução de NRF2, de NOX4, de HIF1 α e de VEGF e ao aumento de Endostatina.

A associação dos fármacos também foi a melhor alternativa para o tratamento da PIN, provavelmente devido à normalização da resposta inflamatória, à normalização dos níveis de GSH-Px1, à redução de NOX4 e de AR citoplasmáticos e à redução de HIF1 α e de VEGF.

O PMAPA se mostrou a melhor abordagem terapêutica contra o adenocarcinoma de grau intermediário e de alto grau, pois reduziu suas frequências, sem aumentar a frequência do adenocarcinoma de baixo grau. Nossos dados sugerem que seus efeitos ocorram através da indução de uma resposta inflamatória do tipo aguda, com manutenção de TLR4, aumento intranuclear de NF κ B e manutenção de altos níveis de TNF α e IL6; da manutenção dos níveis de ER β e redução de AR e ER α , da recuperação do sistema de enzimas antioxidantes, com manutenção da Catalase e da GPx1, além da diminuição da hipóxia, com redução de HIF1 α , melhora da perfusão tumoral (aumento ou manutenção de VEGF) e aumento da endostatina.

Apesar dos benefícios do PMAPA e de sua combinação com o TNP470 contra diferentes lesões prostáticas, futuros estudos sobre o papel do PMAPA na modulação dos receptores de andrógeno e estrógeno, da p53, da PI3K e da Akt ainda devem ser executados para justificar e corroborar sua atividade antitumoral contra o CP e garantir o avanço para estudos translacionais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLLAHI A, HAHNFELDT P, MAERCKER C, GRÖNE HJ, DEBUS J, ANSORGE W. *et al.* 2004. Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Molecular Cell*. 13(5), 649-663.
- ADAMS JY, LEAV I, LAU KM, HO SM, PFLUEGER SM. 2002. Expression of estrogen receptor beta in the fetal, neonatal, and prepubertal human prostate. *Prostate*. 52, 69-81.
- AKIRA S, TAKEDA K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499-511.
- ALLAVENA P, SICA A, GARLANDA C, *et al.* 2008. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev*. 222, 155-161.
- ALVAREZ-TEJADO M, NARANJO-SUAREZ S, JIMENEZ C, CARRERA AC, LANDAZURI MO, DEL PESO L. 2001. Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol3-kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis. *J Biol Chem*. 276, 22368-22374.
- ANASSI E, NDEFO UA. 2011. Sipuleucel-T (Provenge) injection. The first immunotherapy agent (Vaccine) for hormone-refractory prostate cancer. *PT*, 36(4), 197-202.
- AUMÜLLER G. & SEITZ J. 1990. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int Rev Citol*. 121, 127-231.
- BADJATIA N, SATYAM A, SINGH P, *et al.* 2010. Altered antioxidant status and lipid peroxidation in Indian patients with urothelial bladder carcinoma. *Urol Oncol*. 28, 360-367.
- BAKER AM, OBERLEY LW, COHEN MB. 1997. Expression of antioxidant enzymes in human prostatic adenocarcinoma. *Prostate*. 32, 229-33.
- BATTISTI V, MADERS LDK, BAGATINI MD, REETZ LGB, CHIESA J, BATTISTI IE, *et al.* 2011. Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients: Relation to Gleason score, treatment and bone metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 65, 516-524.
- BAYRAKTAR N, KILIC S, BAYRAKTAR MR, *et al.* 2010. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in cancerous bladder tissue and their relation with bacterial infection: a controlled clinical study. *J Clin Lab Anal*. 24, 25-30.
- BEN-BARUCH A. 2006. The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer Metastasis Rev*. 25, 357-371.
- BERRY PA, MAITLAND NJ & COLLINS AT. 2008. Androgen receptor signaling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Mol Cell Endocrinol*. 288(1-2), 3037.
- BLANDY JP, LYTTON B. 1986. What is the prostate? *Comp. Anat*. 3, 1-11.
- BOK RA. 2008. Treatment of prostate cancer: therapeutic potential of targeted immunotherapy with APC8015. *Ther Clin Risk Manag*. 4(1), 79-85.
- BOSLAND MC, PRINSEN MK. 1990. Induction of dorsolateral prostate adenocarcinomas and other accessory sex gland lesions in male Wistar rats by a single administration of N-methyl-N-nitrosourea, 7,12-dimethylbenz-(a)anthracene and 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl after sequential treatment with cyproterone acetate and testosterone propionate. *Cancer Res*. 50, 691-699.

- BOSTWICK DG, QIAN J. 2004. High grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Modern Pathology*. 17, 360-379.
- BROWN JA, DORFMAN DM, MA FR, SULLIVAN EL, MUNOZ O, WOOD CR. *et al.* 2003. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol*. 170, 1257–1266.
- BROWN NS, BICKNELL R. 2001. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: Oxidative stress, its effects on the growth, metastatic potential, and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 3, 323–327.
- BROWN-BORG HM, BODE AM, BARTKE A. 1999. Antioxidative mechanisms and plasma growth hormone Levels: Potencial relationship in the aging process. *Endocrine*. 11, 41-8.
- BULL JH, ELLISON G, PATEL A, MUIR G, WALKER M, UNDERWOOD M. *et al.* 2001. Identification of potential diagnostic markers of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia using cDNA microarray. *Br J Cancer*. 84(11), 1512-1519.
- CAMPBELL SC. 1997. Advances in angiogenesis research: relevance to Urological oncology. *J. Urol*. 158, 1633-1674.
- CASTRONOVO V, BELOTTI D. 1996. TNP-470 (AMG-1470): Mechanisms of action and early clinical development. *Eur J Cancer*. 3, 2520-2527.
- CHEN CD, WELSBIE DS, TRAN C, BAEK SH, CHEN R, VESELLA R. *et al.* 2004. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med*. 10, 33–9.
- COLOMBEL MC & BUTTYAN R. 1995. Hormonal control of apoptosis: the rat prostate gland as a model system. *Methods Cell Biol*. 46, 369-385.
- COSTELLO LC & FRANKLIN RB. 1994. Effect of prolactin on the prostate. *Prostate*. 24(3), 162166.
- CORNELL RJ, ROWLEY D, WHELLER T, ALI N, AYALA G. 2003. Neuroepithelial interactions in prostate cancer are enhanced in the presence of prostatic stroma. *Urology*. 61, 870-875.
- CUNHA GR, MATRISIAN LM. 2002. It's not my fault, blame it on my microenvironment. *Differentiation*. 70, 469-472.
- DAVIES, P. & EATON, C.L. 1991. Regulation of prostate growth. *Journal of Endocrinology*. 131, 5-11.
- DE MARZO AM, MARCHI VL, EPSTEIN JI, NELSON WG. 1999. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol*. 155, 1985-1992.
- DE MARZO AM, MEEKER AK, ZHA S, LUO J, NAKAYAMA M, PLATZ EA, ISAACS WB, NELSON WG. 2003. Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology*. 62(5A), 55-62.
- DE MARZO AM, NAKAI Y, NELSON WG. 2007. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol Oncol*. 25, 398-400.

- DONG H, STROME SE, SALOMAO DR, *et al.* 2002. Tumor-associated B7–H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 8, 793–800.
- DROLLER MJ. 1997. Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br J Urol.* 79, 42-52.
- DU Z, FUJIYAMA C, CHEN Y, MASAKI Z. 2003. Expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in human normal, benign, and malignant prostate tissue. *Chin. Med. J.* 116, 1936–1939.
- DURÁN N, NUNES ODS. 1990. Characterization of an aggregated polymer from *Penicillium* sp. (PB-7 Strain). *Brazilian J Med Biol Res.* 23, 1289-1302.
- DURÁN N, SOUZA BRITO ARM, HAUN M *et al.* 1993. SB-73: Immunomodulator Agent. *Drugs Fut.* 18, 327-334.
- DURÁN N, JUSTO GZ, SOUZA-BRITTO ARM *et al.* 1997. SB-73/P-MAPA: Protein magnesium phospholipid palmitoleate anhydride. *Drugs Fut.* 22, 454.
- EICHHORN ME, KLEESPIES A, ANGELE MK, JAUCH KW, BRUNS CJ. 2007. Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. *Langenbecks Arch Surg.* 392, 371–379.
- ELICEIRI BP, PAUL R, SCHWARTZBERG PL, HOOD JD, LENG J, CHERESH DA. 1999. Selective requirement for Src kinase during VEGF induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell.* 4, 915-924.
- ELSBACH P, WEISS P. 1983. A revaluation of the roles of O₂- dependent and O₂- independent microbicidal systems of phagocytes. *Rev Infect Dis.* 5, 843-53.
- FÁVARO WJ, NUNES OS, SEIVA FR, NUNES IS, WOOLHISER LK, DURAN N *et al.* 2012. Effects of P-MAPA immunomodulator on Toll-like receptors and p53: Potential therapeutic strategies for infectious diseases and cancer. *Infect Agent Cancer.* 7, 01-15.
- FAVARO WJ, DURAN N, GARCIA PV, BUENO CPS, APOLINARIO LM. Composition for controlled release of carcinogen and use, 2014, Brazil. Patent: novelty privilege. Register number: BR1020140231188. INPI-National Institute of Industrial Property.
- FLESHNER, N.E.; KLOTZ, L.H. 1999. Diet, androgens, oxidative stress and prostate cancer susceptibility. *Cancer Metast. Rev.* 17, 325–330.
- FOLKMAN J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 285, 1182-1186.
- FOLKMAN JHP. 2006. Antiangiogenesis in cancer therapy-endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res.* 312, 594–606.
- FONG TA, SHAWVER LK, SUN L, TANG C, APP H, POWELL TJ *et al.* 1999. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res.* 59(1), 99–106.

- FU M, LIU M, SAUVE AA, SAUVE AA, JIAO X, ZHANG X *et al.* 2006. Hormonal control of androgen receptor function through SIRT1. *Mol Cell Biol.* 26, 8122–35.
- FUJITA H, KOSHIDA K, KELLER ET, TAKAHASHI Y, YOSHIMOTO T, NAMIKI M *et al.* 2002. Cyclooxygenase-2 promotes prostate cancer progression. *Prostate* 53, 232-240.
- GALLI R, STARACE D, BUSÀ R, ANGELINI DF, PAONE A, DE CESARIS P. *et al.* 2010. TLR stimulation of prostate tumor cells induces chemokine-mediated recruitment of specific immune cell types. *J Immunol.* 184, 6658-69.
- GARCIA PV, APOLINARIO LM, BOCKELMANN PK, NUNES IS, DURAN N, FAVARO WJ. 2015. Alterations in ubiquitin ligase Siah-2 and its corepressor N-CoR after P-MAPA immunotherapy and anti-androgen therapy: new therapeutic opportunities for non-muscle invasive bladder cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 8(5), 4427–4443.
- GERVAZ, P.; FONTOLLIET, C. 1998. Therapeutic potential of the antiangiogenesis drug TNP-470. *Int J Exp Pathol.* 79, 359-362.
- GERVAZ P, SCHOLLB, PADRUN V, GILLET M. 2000. Growth inhibition of liver metastases by the anti-angiogenic drug TNP470. *Liver.* 20(2), 108-113.
- GINGRICH JR, BARRIOS RJ, FOSTER BA, GREENBERG NM. 1999. Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2(2), 70–75.
- GLINA S, RIVERO MA, MORALES A, MORGENTALER A. *et al.* 2010. Studies on Prostatic Cancer I. 2010. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate by Charles Huggins and Clarence V. Hodges. *J Sex Med.* 7, 640–4.
- GONÇALVES BF, ZANETONI C, SCARANO WR, GOES RM, VILAMAIOR PS, TABOGA SR. *et al.* 2010. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (mnu) in gerbils: Histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. *Exp Mol Pathol.* 88, 96–106.
- GONÇALVES BF, DE CAMPOS SG, ZANETONI C, SCARANO WR, FALLEIROS LR JR, AMORIM RL. *et al.* 2013. A New Proposed Rodent Model of Chemically Induced Prostate Carcinogenesis: Distinct Time-Course Prostate Cancer Progression in the Dorsolateral and Ventral Lobes. *Prostate* 73, 1202-1213.
- GONG G, WARIS G, TANVEER R. *et al.* 2001. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98, 9599-9604.
- GONZALEZ-REYES S, GONZALEZ LO, GONZALEZ JM, FERNANDEZ JMF, AGUIRRE A, ESCAFF S. *et al.* 2011. Study of TLR3, TLR4 and TLR9 in breast carcinomas and their association with metastasis. *BMC Cancer.* 10, 665.
- GRAHAM KA, KULAWIEC M, OWENS KM, LI X, DESOUKI MM, CHANDRA D, *et al.* 2010. NADPH oxidase is an oncoprotein localized to mitochondria. *Cancer Biology & Therapy.* 10(3), 223-231.

GREENBERG NM, DEMAYO F, FINEGOLD MJ, MEDINA D, TILLEY WD, ASPINALL JO, CUNHA GR, DONJACOUR AA, MATUSIK RJ, ROSEN JM. 1995. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci.* 92(8), 3439–3443.

GROSSMANN M, CHEUNG AS, ZAJAC JD. 2013. Androgens and prostate cancer; pathogenesis and deprivation therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 27(4), 603-16.

HARRIS MT, FELDBERG RS, LAU KM, LAZARUS NH, COCHRANE DE. 2000. Expression of proinflammatory genes during estrogen-induced inflammation of the rat prostate, *Prostate.* 44, 19–25.

HETGE P, HARVEY EB, LINEHAN WM, SILVERMAN DT, SULLIVAN JW, HOOVERRN, *et al.* 1990. Unexplained excess risk of bladder cancer in men. *J Natl Cancer Inst.* 82(20), 1636-1640.

HO E, BOILEAU TW, BRAY T.M. 2004. Dietary influences on endocrine inflammatory interactions in prostate cancer development, *Arch.Biochem. Biophys.* 428, 109–117.

HORII K, SUZUKI Y, KONDO Y, AKIMOTO M, NISHIMURA T, YAMABE Y *et al.* 2007. Androgen-dependent gene expression of prostate specific antigen is enhanced synergistically by hypoxia in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Res.* 5, 383-391.

HOU L, MORI D, TAKASE Y, MEIHUA P, KAI K, TOKUNAGA O. 2009. Fumagilin inhibits colorectal cancer growth and metastasis in mice: in vivo and in vitro study of anti-angiogenesis. *Pathol Int.* 59(7), 448-461.

HSING AW, REICHARDT JKV, STANCZYK FZ. 2002. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate.* 52, 213-235.

HUA D, LIU MY, CHENG ZD, QIN XJ, ZHANG HM, CHEN Y *et al.* 2009. Small interfering RNA-directed targeting of Toll-like receptor 4 inhibits human prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity. *Mol Immunol.* 46, 2876-2884.

HUANG B, ZHAO J, LI H, HE KL, CHEN Y, CHEN SH. *et al.* 2005. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res.* 65, 5009–5014.

HUSS WJ, HANRAHAN CF, BARRIOS RJ, SIMONS JW, GREENBERG NM. 2001. Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch. *Cancer Res.* 61(6), 2736–2743.

ICHIMURA Y, HABUCHI T, TSUCHIYA N, WANG L, OYAMA C, SATO K. *et al.* 2004. Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. *J Urol.* 172, 728-32.

IMAMOV O. 2004. Estrogen Receptor β in Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 351, 2773-2774.

IMAMOV O, SHIM GJ, WARNER M, GUSTAFSSON JA. 2005. Estrogen receptor Beta in health and disease. *Biol Reprod.* 73, 866-71.

JAIN RK. 2005. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307, 58-62.

JAIN RK. 2014. Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. *Cancer Cell*. 26, 605-622.

JEGO G, BATAILLE R, GEFFROY-LUSEAU A, DESCAMPS G, PELLAT-DECEUNYNCK C. *et al.* 2006. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia*. 20, 1130–1137.

JORCYK CL, LIU ML, SHIBATA MA, MAROULAKOU IG, KOMSCHLIES KL, MCPHAUL MJ, *et al.* 1998. Development and characterization of a mouse prostate adenocarcinoma cell line: ductal formation determined by extracellular matrix. *Prostate*. 34(1), 10-22.

JUSTO GZ, DURÁN N, QUEIROZ MLS. 1999. Effects on splenic T lymphocytes in Ehrlich ascites tumor-bearing mice (EAT) induced by P-MAPA - Role of cytokines. *Int J Mol Med*. 4, S49.

JUSTO GZ, DURÁN N, QUEIROZ MLS. 2003. Natural killer cell activity, lymphocyte proliferation and cytokines profile in tumour-bearing mice treated with P-MAPA, a magnesium aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*. *Immunopharm Immunotoxicol*. 25, 305-319.

KAMATH A, HELIE M, BIFULCO CB, LI WW, CONCATO J, JAIN D. 2009. Lack of immunohistochemical detection of VEGF in prostate carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 17, 227-232.

KENSLER TW, WAKABAYASHI N, BISWAL S. 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 47, 89-116.

KENSLER TW, WAKABAYASHI N. 2010. Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis*. 31, 90–99.

KHANDRIKA L, KUMAR B, KOUL S, MARONI P, KOUL HK. 2009. Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett*. 282(2), 125-136.

KIDO LA, HETZL AC, CANDIDO EM, MONTICO F, LORENCINI RM, CAGNON VHA. 2014. Antiangiogenic and finasteride therapies: Responses of the prostate microenvironment in elderly mice. *Life Sci*. 106, 58-70.

KIMBRO KS & SIMONS JW. 2006. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 13, 39-49.

KNOX JD, CRESS AE, CLARK V, MANRIQUEZ L, AFFINITO KS, DALKIN BL, *et al.* 1994. Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha 6-integrins in the normal and neoplastic prostate. *Am J Pathol*. 145(1), 167-174.

KREIS T & VALE R. Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins. New York: Oxford University Press, 1999.

KRIEG AM. 2007. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J Clin Invest*. 117, 1184–1194.

- KRIEG M, NASS R, TUNN S. 1993. Effect of aging on endogenous level of 5 α -dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, and estrone in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate. *J Clin Endocrinol Metab.* 77, 375-381.
- KUMAR H, KAWAI T, AKIRA S. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.* 30, 1634.
- LAU A, VILLENEUVE NF, SUN Z, WONG PK, ZHANG DD. 2008. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res.* 58, 262–70.
- LAMBETH JD. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.*, 4, 181-189.
- LEAV I, LAU KM, ADAMS JA, MCNEAL JE, TAPLIN ME, WANG J. *et al.* 2001. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am J Pathol.* 159, 79-92.
- LEVINE AC, LIU XH, GREENBERG PD, ELIASHVILI M, SCHIFF JD, AARONSON SA. *et al.* 1998. Androgens induce the expression of vascular endothelial growth factor in human fetal prostatic fibroblasts. *Endocrinol.* 139(11), 4672-4678.
- LI Y, IZUMI K, MIYAMOTO H. 2012. The role of the androgen receptor in the development and progression of bladder cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 42(7), 569-577.
- LIEKENS S, DE CLERCQ E, NEYTS J. 2001. Angiogenesis: Regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol.* 61(3), 253-270.
- LIN CQ & BISSELL MJ. 1993. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.* 7(9), 737-743.
- LIU XH, KIRSCHENBAUM A, YU K, YAO S, LEVINE AC. 2005. Cyclooxygenase-2 suppress hypoxia-induced apoptosis via a combination of direct and indirect inhibition of p53 activity in a human prostate cancer cell line. *J Biol Chem.* 280, 3817-3823.
- LU JP, MONARDO L, BRYSKIN I, HOU ZF, TRACHTENBERG J, WILSON BC. *et al.* 2010. Androgen induce oxidative stress and radiation resistance in prostate cancer cells through NADPHoxidase. *Prostate Cancer and Prostatic Disease.* 13(1), 39-46.
- LUO JL, KAMATA H, KARIN M. 2005. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death – a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest.* 115, 2625–2632.
- MACPHERSON GR, NG SSW, FORBES SL, MELILLO G, KARPOVA T, MCNALLY J *et al.* 2003. Anti-angiogenic activity of human endostatin is HIF-1-independent in vitro and sensitive to timing of treatment in a human saphenous vein assay. *Mol Cancer Ther.* 2(9), 845–854.
- MAJUMDER PK, GRIZANSIO C, O'CONNELL F, BARRY M, BRITO J, XU Q. *et al.* 2008. A prostatic intraepithelial neoplasia-dependent p27 Kip1 checkpoint induces senescence and inhibits cell proliferation and cancer progression. *Cancer Cell.* 14(2), 146-155.

- MAK P, LI J, SAMANTA S, CHANG C, JERRY DJ, DAVIS RJ. *et al.* 2015. Prostate Tumorigenesis Induced by PTEN Deletion Involves Estrogen Receptor β Repression. *Cell Reports*. 10, 1982–1991.
- MANTOVANI A, ALLAVENA P, SICA A. *et al.* 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*. 454, 436–444.
- MARIGNOL L, COFFEY M, LAWLER M, HOLLYWOOD D. 2008. Hypoxia in prostate cancer: a powerful shield against tumour destruction? *Cancer Treat Rev*. 34, 313–327.
- MARKER PC, DONJACOUR AA, DAHIYA R, CUNHA GR. 2003. Hormonal, cellular and molecular control of prostatic development. *Dev Biol*. 253(2), 165–174.
- MATIC M, SIMIC T, DRAGICEVIC D. 2010. Isoenzyme profile of glutathione transferases in transitional cell carcinoma of upper urinary tract. *Transl Res*. 155, 256–262.
- MATIJEVIC T, PAVELIC J. 2010. Toll-like receptors: cost or benefit for cancer? *Curr Pharm Des*. 16, 1081–90.
- MELO A, JUSTO GZ, QUEIROZ MLS. 2001. Stimulation of myelopoiesis in *Listeria monocytogenes*-infected mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. *Human Exp. Toxicol*. 20, 38–45.
- MENG Q, PENG Z, CHEN L, SI J, DONG Z, XIA Y. *et al.* 2010. Nuclear Factor- κ B modulates cellular glutathione and prevents oxidative stress in cancer cells. *Cancer Lett*. 299, 45–53.
- MIKI J. 2009. Investigations of prostate epithelial stem cells and prostate cancer stem cells. *Int J Urol*. 17(2), 139–147.
- MONTICO F, KIDO LA, HETZL AC, LORENCINI RM, CANDIDO EM, CAGNON VH. 2014. Antiangiogenic therapy effects on age-associated matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and insulin-like growth factor receptor-1 (IGFR-1) responses: A comparative study of prostate disorders in aged and TRAMP mice. *Histochem Cell Biol*. 42, 269–284.
- MONTICO F, KIDO LA, HETZL AC, CAGNON VHA. 2015. Prostatic angiogenic responses in the late life: antiangiogenic therapy influences and relation with the glandular microenvironment in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model. *Prostate* 5, 484–499.
- MURPHY G, TJOA B, RAGDE H, KENNY G, BOYNTON A. 1996. Phase 1 clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate*, 29(6), 371–380.
- NELSON EC, CAMBIO AJ, YANG JC, OK JH, LARA JR. PN, EVANS CP. 2007. Clinical implications of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 10, 6–14.
- NELSON WG, DE MARZO AM, DEWEESE TL, ISAACS WB. 2004. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *J Urol*, 172, S6–S12.
- NIU YN & XIA SJ. 2009. Stroma-epithelium crosstalk in prostate cancer. *Asian J Androl*. 11(1), 2835.

- O'DONNELL L, ROBERTSON KM, JONES ME, SIMPSON ER. 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews*. 22(3), 289-318.
- O'REILLY MS, BOEHM T, SHING Y, FUKAI N, VASIOS G, LANE WS *et al.* 1997. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 88(2), 277-285.
- PAHL HL. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 18, 6853-6866.
- PAONE A, STARACE D, GALLI R, PADULA F, DE CESARIS P, FILIPPINI A. *et al.* 2008. Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC- α -dependent mechanism. *Carcinogenesis*. 29, 1334-1342.
- PARTIN AW, GETZENBERG RH, CARMICHAEL MJ, VINDIVICH D, YOO J, EPSTEIN JI. *et al.* 1993. Nuclear matrix protein patterns in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Cancer Res*. 53, 744-746.
- PHAM CG, BUBICI C, ZAZZERONI F, PAPA S, JONES J, ALVAREZK. *et al.* 2004. Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappa B inhibits TNF alpha induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. *Cell*. 119, 529-542.
- PIKARSKY E, PORAT RM, STEIN I, ABRAMOVITCH R, AMIT S, KASEM S. *et al.* 2004. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*. 431, 461-466.
- POLLARD M, LUCKERT PH. 1987. Autochthonous prostate adenocarcinomas in Lobund-Wistar rats: a model system. *Prostate*, 11(3), 219-27.
- POLLARD M, LUCKERT PH, SCHEU J. 1995. Phenobarbital promotes the development of adenocarcinomas in the accessory sex glands of MNU-inoculated L-W rats. *Carcinogenesis*. 16(10), 2419-21.
- PRINS GS, BIRCH L, GREENE GL. 1991. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology*. 129(6), 3187-3199.
- PUTZI MJ, DE MARZO AM. 2000. Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology*. 56, 828-832.
- QADRI AS, SAMEER AS, SHAH ZA, HAMID A, ALAM S, MANZOOR S. *et al.* 2011. Genetic polymorphism of the glutathione S transferase P1 gene (GSTP1) and susceptibility to prostate cancer in the Kashmiri population. *Genet. Mol. Res*. 10(4), 3038-3045.
- RAKOFF-NAHOUM S, MEDZHITOV R. 2009. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 9, 57-63.
- RIDDELL JR, BSHARA W, MOSER MT, SPERNYAK JA, FOSTER BA, GOLLNICK SO. 2001. Peroxiredoxin 1 Controls Prostate Cancer Growth through Toll-Like Receptor 4-Dependent Regulation of Tumor Vasculature. *Cancer Research*. 71(5), 1637-1646.

- RISBRIDGER G, WANG H, YOUNG P, KURITA T, WANG YZ, LUBAHN D. *et al.* 2001. Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor- α mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Dev Biol.* 229(2), 432-442.
- RISBRIDGER GP, ELLEM S, MCPHERSON, SJ. 2007. Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling. *J Mol Endocrinol.* 39, 183-188.
- ROBERT NJ, DIÉRAS V, GLASPY J, BRUFISKY AM, BONDARENKO I, LIPATOV ON *et al.* 2011. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 29, 1252-1260.
- SALAUN B, LEBECQUE S, MATIKAINEN S, RIMOLDI D, ROMERO P. 2007. Toll like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin Cancer Res.* 13, 4565–74.
- SATOH H, MORIGUCHI T, TAKAI J, EBINA M, YAMAMOTO M. 2013. Nrf2 prevents initiation but accelerates progression through the Kras signaling pathway during lung carcinogenesis. *Cancer Res.* 73, 4158–68.
- SCHLEICHER RL, FALLON MT, AUSTIN GE, ZHENG M, ZHANG M, DILLEHAY DL *et al.* 1996. Intravenous vs. intraprostatic administration of n-methyl-n-nitrosourea to induce prostate cancer in rats. *Prostate.* 28, 32-43.
- SCHMIDT A, SOMMER F, OZGUR E, KLOTZ T, ENGELMANN U, ADDICKS K. *et al.* 2004. Vessels in benign prostatic hyperplasia contain more binding sites for Endostatin than vessels in normal prostate tissue. *Eur Urol.* 46(6), 765-7.
- SCHWEIZER MT, DRAKE CG. 2014. Immunotherapy for prostate cancer: recent developments and future challenges. *Cancer Metastasis Rev.* 33 (3), 641-655.
- SEMENZA GL. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3, 721-32.
- SETCHELL BP, BROOKS PE. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL E, NEILL J. *The Physiology of Reproduction.* New York: Raven Press, 753-836, 1988.
- SHI H, HUDSON LG, DING W, WANG S, COOPER KL, LIU S. *et al.* 2004. Arsenite causes DNA damage in keratinocytes via generation of hydroxyl radicals. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 871–878.
- SHIBATA T, OHTA T, TONG KI, KOKUBU A, ODOGAWA R. 2008. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc Natl Acad Sci.* 105(36), 13568–13573.
- SHAPPELL SB, THOMAS GV, ROBERTS RL, HERBERT R, ITTMANN MM, RUBIN MA. *et al.* 2004. 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 Res.* 64, 2270-2305.
- SHANG Y, MYERS M, BROWN M. 2002. Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell.* 9, 601–10.

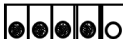
- SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. 2012. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 62, 10-29.
- SIN N, MENG L, WANG MQ, WEN JJ, BORNMANN WG, CREWS CM. 1997. The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase MetAP-2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(12), 6099–6103.
- SINGH US, SHANKAR R, YADAV GP, KHARKWAL G, DWIVEDI A, KESHRI G. *et al.* 2008. Synthesis and structure guided evaluation of estrogen agonist and antagonist activities of some new tetrazolyl indole derivatives. *Eur J Med Chem.* 10, 2149-2158.
- SINGH A, HAPPEL C, MANNA SK, ACQUAAH-MENSAH G, CARRERERO J. 2016. Transcription factor NRF2 regulates miR-1 and miR-206 to drive tumorigenesis. *J Clin Invest.* 123(7), 2921-2934.
- SLAYTER MV, ANZANO MA, KADOMATSU K, SMITH JM, SPORN MB. 1994. Histogenesis of induced prostate and seminal vesicle carcinoma in Lobund-Wistar rats: a system for histological scoring and grading. *Cancer Res.* 54(6), 1440-1445.
- SUGIMURA Y, CUNHA GR, DONJACOUR AA. 1986. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod.* 34(5), 961-971.
- TAIPALE J & KESKI-OJA J. 1997. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.* 11(1), 51-59.
- TAKEDA K, KAISHO T, AKIRA S. 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335–376.
- TAM NN, GAO Y, LEUNG YK, HO SM. 2003. Androgenic regulation of oxidative stress in the rat prostate: involvement of NAD(P)H oxidases and antioxidant defense machinery during prostatic involution and regrowth. *Am J Pathol.* 163, 2513–2522.
- TEWARI KS, SILL MW, LONG HJ, 3RD PENSON RT, HUANG H, RAMONDETTA LM *et al.* 2014. Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer. *N Engl J Med.* 370, 734-743.
- TOORIAN AW, KELLEHER S, GOOREN LJ, JIMENEZ M, HANDELSMAN DJ. 2003. Estimating the contribution of the prostate to blood dihydrotestosterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 88, 5207-5211.
- TOWNSEND DM, TEW KD. 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene.* 22, 7369–7375.
- TUXHORN JA, AYALA GE, ROWLEY DR. 2001. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol.* 166(6), 2472-2483.
- UNTERGASSER G, MADERSBACHER S, BERGER P. 2005. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue remodeling. *Exp Gerontol.* 40, 121-8.
- USHIO-FUKAI M, NAKAMURA Y. 2008. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett.* 266, 37–52.

- VAN MOORSELAAR RJ, VOEST EE. 2002. Angiogenesis in prostate cancer: Its role in disease progression and possible therapeutic approaches. *Mol Cell Endocrinol.* 197(1-2), 239-250.
- WALTENBERGER J. 2009. VEGF resistance as a molecular basis to explain the angiogenesis paradox in diabetes mellitus. *Biochem Soc Trans.* 37, 1167-1170.
- WANG KY, JAN AS, GURR JR. 2007. Trivalent arsenicals induce lipid peroxidation, protein carbonylation, and oxidative DNA damage in human urothelial cells. *Mut. Res.* 615, 75–86.
- WEIHUA Z, MAKELA S, ANDERSSON LC, SALMI S, SAJI S, WEBSTER JI. *et al.* 2001. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 8, 6330-6335.
- WEIHUA Z, LATHE R, WARNER M, GUSTAFSSON J. 2002. An endocrine pathway in the prostate, ER β , AR, 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol, and CYP7B1, regulates prostate growth. *PNAS.* 99(21), 13589-13594.
- WONG, Y.C., XIE, W. & TSAO, S.W. 2000. Structural changes and alteration in expression of TGF β 1 and its receptors in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in the ventral prostate of noble rats. *Prostate.* 45(4), 289-298.
- WU K, KATIYAR S, WITKIEWICZ A, LI A, MCCUE P, SONG L, *et al.* 2009. The cell fate determination factor Dachshund inhibits androgen receptor signaling and prostate cancer cellular growth. *Cancer Res.* 69(8), 3347–55.
- ZHONG H, DE MARZO AM, LAUGHNER E, LIM M, HILTON DA, ZAGZAG D *et al.* 1999. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 59, 5830-5835.
- ZHOU LZ, JONHSON AP, RANDO TA. 2001. NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 31, 1405-1416.
- ZHU M, BI X, JIA Q, SHANGGUAN S. 2009. The possible mechanism for impaired angiogenesis after transient focal ischemia in type 2 diabetic GK rats: Different expressions of angiostatin and vascular endothelial growth factor. *Biomed Pharmacother.* 64, 208-213.

8. ANEXOS: TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Representação esquemática da atribuição de nota para os compartimentos supranuclear, intranuclear e em todo o citoplasma.

Compartimento Supranuclear				
Percentil de Células Marcadas	Intensidade			
	Nota 0 (sem marcação)	Nota 1 (leve)	Nota 2 (moderada)	Nota 3 (intensa)
Nota 0 (0%)	 Não é possível atribuir nota			
Nota 1 (0% < nº de células marcadas ≤ 50%)		 Nota = $1^1 = 1$	 Nota = $1^2 = 1$	 Nota = $1^3 = 1$
Nota 2 (50% < nº de células marcadas < 100%)		 Nota = $2^1 = 2$	 Nota = $2^2 = 4$	 Nota = $2^3 = 8$
Nota 3 (100%)		 Nota = $3^1 = 3$	 Nota = $3^2 = 9$	 Nota = $3^3 = 27$

Compartimento Intranuclear				
Percentil de Células Marcadas	Intensidade			
	Nota 0 (sem marcação)	Nota 1 (leve)	Nota 2 (moderada)	Nota 3 (intensa)
Nota 0 (0%)	 Não é possível atribuir nota			
Nota 1 (0% < nº de células marcadas ≤ 50%)		 Nota = $1^1 = 1$	 Nota = $1^2 = 1$	 Nota = $1^3 = 1$
Nota 2 (50% < nº de células marcadas < 100%)		 Nota = $2^1 = 2$	 Nota = $2^2 = 4$	 Nota = $2^3 = 8$
Nota 3 (100%)		 Nota = $3^1 = 3$	 Nota = $3^2 = 9$	 Nota = $3^3 = 27$

Localização: em todo o citoplasma				
Percentil de Células Marcadas	Intensidade			
	Nota 0 (sem marcação)	Nota 1 (leve)	Nota 2 (moderada)	Nota 3 (intensa)
Nota 0 (0%)	 Não é possível atribuir nota			
Nota 1 (0% < nº de células marcadas ≤ 50%)		 Nota = $1^1 = 1$	 Nota = $1^2 = 1$	 Nota = $1^3 = 1$
Nota 2 (50% < nº de células marcadas < 100%)		 Nota = $2^1 = 2$	 Nota = $2^2 = 4$	 Nota = $2^3 = 8$
Nota 3 (100%)		 Nota = $3^1 = 3$	 Nota = $3^2 = 9$	 Nota = $3^3 = 27$

Tabela 2. Resultados da análise histopatológica dos grupos controle, MNU, MNU+TNP470, MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA de acordo com Shappell et. al., 2004. O diagnóstico das lesões prostáticas envolveu neoplasia intraepitelial de alto grau (HGPIN), atrofia inflamatória proliferativa (PIA), adenocarcinomas de graus baixo (ABG), intermediário (AGI) e alto (AAG), atrofia prostática (AP) e infiltrado inflamatório (II).

	HGPIN	PIA	Micro ácino	HNP	AP	II	ABG	AGI	AAG
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MNU	80%	80%	-	-	-	-	20%	60%	20%
MNU + TNP470	60%	60%	-	60%	100%	-	20%	40%	20%
MNU + PMAPA	60%	20%	60%	80%	80%	60%	20%	-	-
MNU+ TNP470+ PMAPA	40%	-	100%	40%	60%	60%	40%	40%	-

Tabela 3. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica para TLR4, NFkB, IL6 e TNF α em regiões de epitélio normal dos Grupos: Controle, MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

Proteínas	Grupos	Animais (%)	Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
			SN		IN		C				
			PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
TLR4	Controle	60	0	0	1	1	3	1	0	1	3
	MNU	60	0	0	1	1	3	3	0	1	27
	MNU+PMAPA	40	0	0	1	1	3	3	0	1	27
	MNU+TNP470	40	0	0	1	1	3	2	0	1	9
	MNU+TNP470+PMAPA	40	0	0	1	2	3	3	0	1	27
NFkB	Controle	60	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU	100	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+PMAPA	100	0	0	3	2	3	2	0	9	9
	MNU+TNP470	40	0	0	3	1	3	1	0	3	3
		40	0	0	3	2	3	2	0	9	9
	MNU+TNP470+PMAPA	60	0	0	3	1	3	1	0	3	3
IL6	Controle	80	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU	60	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+PMAPA	80	0	0	3	1	3	1	0	3	3
	MNU+TNP470	60	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470+PMAPA	60	0	0	2	2	3	2	0	4	9
TNF α	Controle	100	0	0	0	0	3	3	0	0	27
	MNU	60	0	0	0	0	3	3	0	0	27
	MNU+PMAPA	80	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470	60	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470+PMAPA	80	0	0	0	0	3	2	0	0	9

Tabela 4. Percentual de animais com marcação de Imunohistoquímica de TLR4, NFkB, IL6 e TNF α no estroma dos grupos Controle, MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA.

Proteínas	Grupo	Componente Marcado (% dos animais)		
		Endotélio	Músculo Liso	Células Inflamatórias
TLR4	Controle	100	80	100
	MNU	100	80	100
	MNU+PMAPA	100	80	100
	MNU+TNP470	60	20	60
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	60
NFkB	Controle	100	80	100
	MNU	100	100	100
	MNU+PMAPA	100	100	100
	MNU+TNP470	80	80	80
	MNU+TNP470+PMAPA	60	100	100
IL6	Controle	80	80	80
	MNU	80	0	100
	MNU+PMAPA	100	0	100
	MNU+TNP470	80	20	100
	MNU+TNP470+PMAPA	60	0	100
TNFα	Controle	0	0	100
	MNU	0	0	100
	MNU+PMAPA	0	0	100
	MNU+TNP470	0	0	100
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	100

Tabela 5. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica de TLR4 nas lesões prostáticas dos Grupos MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

TLR4		Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
Lesões Prostáticas	Grupos	SN		IN		C				
		PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
PIN	MNU	0	0	1	1	3	2	0	1	9
	MNU+PMAPA	0	0	1	1	3	3	0	1	27
	MNU+TNP470	0	0	1	1	3	1	0	1	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	1	2	2	3	0	2	8
PIA	MNU	0	0	1	1	3	2	0	1	9
	MNU+PMAPA	0	0	1	1	3	2	0	1	9
	MNU+TNP470	0	0	1	1	3	1	0	1	3
AP	MNU+PMAPA	0	0	1	1	3	2	0	1	9
	MNU+TNP470	0	0	1	1	3	1	0	1	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	1	1	3	2	0	1	9
ABG	MNU	0	0	1	1	3	2	0	1	9
	MNU+PMAPA	0	0	1	1	3	2	0	1	9
	MNU+TNP470	0	0	1	1	3	2	0	1	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	1	1	3	2	0	1	9
AGI	MNU	0	0	1	1	3	2	0	1	9
	MNU+TNP470	0	0	1	1	3	2	0	1	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	1	1	2	2	0	1	4
AAG	MNU	0	0	1	2	3	3	0	1	27
	MNU+TNP470	0	0	1	3	3	3	0	1	27

Tabela 6. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica de NFkB nas lesões prostáticas dos Grupos MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

NFkB		Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
Lesões Prostáticas	Grupos	SN		IN		C				
		PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
PIN	MNU	0	0	2	2	3	2	0	4	9
		0	0	2	3	3	3	0	8	27
	MNU+PMAPA	0	0	0	0	3	1	0	0	3
	MNU+TNP470	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	3	1	3	1	0	3	3
PIA	MNU	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	1	0	2	3
AP	MNU+PMAPA	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	1	3	2	0	2	9
ABG	MNU	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470	0	0	3	1	3	2	0	3	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
AGI	MNU	0	0	3	1	3	2	0	3	9
	MNU+TNP470	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	2	3	2	0	4	9
AAG	MNU	0	0	2	2	2	3	0	4	8
	MNU+TNP470	0	0	3	1	3	1	0	3	3

Tabela 7. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica de TNF α nas lesões prostáticas dos Grupos MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

TNF α		Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
Lesões Prostáticas	Grupos	SN		IN		C				
		PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
PIN	MNU	0	0	2	3	3	3	0	8	27
	MNU+PMAPA	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	3	2	0	0	9
PIA	MNU	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+PMAPA	0	0	0	0	3	1	0	0	3
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	1	0	0	3
AP	MNU+PMAPA	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	3	2	0	0	9
ABG	MNU	0	0	3	1	3	1	0	3	3
	MNU+PMAPA	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	1	0	1	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	3	1	0	0	3
AGI	MNU	0	0	3	1	3	2	0	3	9
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	3	2	0	0	9
AAG	MNU	0	0	3	1	3	2	0	3	9
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	1	0	2	3

Tabela 8. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica de IL6 nas lesões prostáticas dos Grupos MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

IL6		Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
Lesões Prostáticas	Grupos	SN		IN		C				
		PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
PIN	MNU	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+PMAPA	0	0	3	2	3	2	0	9	9
		0	0	3	1	3	1	0	3	3
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	1	0	0	3
	MNU+TN470+PMAPA	0	0	0	0	3	1	0	0	3
PIA	MNU	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+PMAPA	0	0	0	0	3	1	0	0	3
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	1	0	0	3
AP	MNU+PMAPA	0	0	3	2	3	2	0	9	9
		0	0	3	1	3	1	0	3	3
	MNU+TNP470	0	0	3	2	3	2	0	9	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	3	1	3	2	0	3	9
ABG	MNU	0	0	3	1	3	1	0	3	3
	MNU+PMAPA	0	0	3	1	3	1	0	3	3
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
AGI	MNU	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
AAG	MNU	0	0	1	2	3	1	0	1	3
	MNU+TNP470	0	0	2	2	3	2	0	4	9

Tabela 9. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica para AR, ER α e ER β em regiões de epitélio normal dos Grupos: Controle, MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

Proteínas	Grupos	Animais (%)	Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
			SN		IN		C				
			PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
AR	Controle	40	0	0	2	3	3	1	0	8	3
		40	0	0	2	3	0	0	0	8	0
	MNU	40	0	0	3	3	3	1	0	27	3
	MNU+PMAPA	80	0	0	2	3	0	0	0	8	0
	MNU+TNP470	60	0	0	2	3	0	0	0	8	0
	MNU+TNP470+PMAPA	80	0	0	2	3	0	0	0	8	0
ER α	Controle	60	0	0	1	2	2	1	0	1	2
		40	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU	80	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+PMAPA	40	0	0	2	1	3	1	0	2	3
		40	0	0	1	1	3	1	0	1	3
	MNU+TNP470	60	0	0	3	1	3	1	0	3	3
	MNU+TNP470+PMAPA	60	0	0	2	1	3	1	0	2	3
ER β	Controle	60	0	0	1	1	3	2	0	1	9
		40	0	0	1	1	3	1	0	1	3
	MNU	40	0	0	2	2	3	2	0	4	9
		40	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+PMAPA	80	0	0	1	1	3	1	0	1	3
	MNU+TNP470	40	0	0	2	1	3	1	0	2	3
		40	0	0	2	1	3	2	0	2	9
	MNU+TNP470+PMAPA	60	0	0	2	1	3	2	0	2	9

Tabela 10. Percentual de animais com marcação de Imunohistoquímica de AR, ER α e ER β no estroma dos grupos Controle, MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA.

		Componente Marcado (% dos animais)		
Proteínas	Grupos	Endotélio	Músculo Liso	Células Inflamatórias
AR	Controle	100	100	80
	MNU	60	100	80
	MNU+PMAPA	0	60	100
	MNU+TNP470	20	100	100
	MNU+TNP470+PMAPA	0	100	100
ER α	Controle	60	0	80
	MNU	0	0	100
	MNU+PMAPA	0	40	80
	MNU+TNP470	0	0	100
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	100
ER β	Controle	100	100	100
	MNU	80	100	100
	MNU+PMAPA	100	100	100
	MNU+TNP470	60	80	100
	MNU+TNP470+PMAPA	100	100	100

Tabela 11. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica de AR nas lesões prostáticas dos Grupos MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

AR		Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
Lesões Prostáticas	Grupos	SN		IN		C				
		PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
PIN	MNU	0	0	2	2	3	1	0	4	3
		0	0	3	3	3	1	0	27	3
	MNU+PMAPA	0	0	2	2	0	0	0	4	0
		0	0	3	3	0	0	0	27	0
	MNU+TNP470	0	0	2	2	3	1	0	4	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	3	3	0	0	0	27	0
PIA	MNU	0	0	2	1	3	1	0	2	3
		0	0	2	2	3	1	0	4	3
	MNU+PMAPA	0	0	3	1	3	1	0	3	3
	MNU+TNP470	0	0	2	1	0	0	0	2	0
AP	MNU+PMAPA	0	0	2	3	0	0	0	8	0
	MNU+TNP470	0	0	2	3	0	0	0	8	0
		0	0	2	2	0	0	0	4	0
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	3	0	0	0	8	0
ABG	MNU	0	0	2	2	3	1	0	4	3
	MNU+PMAPA	0	0	2	3	0	0	0	8	0
	MNU+TNP470	0	0	2	3	0	0	0	8	0
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	3	3	0	0	0	27	0
AGI	MNU	0	0	2	2	3	1	0	4	3
	MNU+TNP470	0	0	2	2	0	0	0	4	0
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	3	0	0	0	8	0
AAG	MNU	0	0	2	2	3	1	0	4	3
	MNU+TNP470	0	0	2	2	3	1	0	4	3

Tabela 12. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica de ER α nas lesões prostáticas dos Grupos MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

ER α		Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
Lesões Prostáticas	Grupos	SN		IN		C				
		PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
PIN	MNU	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+PMAPA	0	0	1	2	3	1	0	1	3
	MNU+TNP470	0	0	1	1	3	1	0	1	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	2	3	1	0	4	3
PIA	MNU	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	1	0	2	3
AP	MNU+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	1	2	0	0	0	1	0
ABG	MNU	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
AGI	MNU	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	2	3	1	0	4	3
AAG	MNU	0	0	1	2	1	2	0	1	1
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	1	0	2	3

Tabela 13. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica de ER β nas lesões prostáticas dos Grupos MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

ER β		Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
Lesões Prostáticas	Grupos	SN		IN		C				
		PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
PIN	MNU	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+PMAPA	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	2	0	2	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	1	1	3	2	0	1	9
PIA	MNU	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	1	0	2	3
AP	MNU+PMAPA	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	2	3	2	0	4	9
ABG	MNU	0	0	1	1	3	1	0	1	3
	MNU+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	2	0	2	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	1	2	3	2	0	1	9
AGI	MNU	0	0	1	1	3	1	0	1	3
	MNU+TNP470	0	0	1	3	3	3	0	1	27
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	1	1	3	1	0	1	3
AAG	MNU	0	0	1	2	1	2	0	1	1
	MNU+TNP470	0	0	1	1	3	1	0	1	3

Tabela 14. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica para Catalase, GSH-Px1, NRF2 e NOX4 em regiões de epitélio normal dos Grupos: Controle, MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

Proteínas	Grupos	Animais (%)	Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
			SN		IN		C				
			PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
CAT	Controle	100	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU	80	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+PMAPA	60	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470	80	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470+PMAPA	100	0	0	0	0	3	2	0	0	9
GSH-Px1	Controle	100	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU	100	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+PMAPA	80	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470	100	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470+PMAPA	60	0	0	0	0	3	2	0	0	9
NRF2	Controle	80	0	0	2	3	3	2	0	8	9
	MNU	60	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+PMAPA	60	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470	60	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470+PMAPA	40	0	0	2	2	3	2	0	4	9
		40	0	0	3	1	3	2	0	3	9
NOX4	Controle	100	0	0	2	3	3	2	0	8	9
	MNU	40	0	0	2	2	3	2	0	4	9
		40	0	0	2	3	3	2	0	8	9
	MNU+PMAPA	60	0	0	2	3	3	2	0	8	9
	MNU+TNP470	60	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470+PMAPA	40	0	0	2	2	3	1	0	4	3
		40	0	0	2	3	3	2	0	8	9

Tabela 15. Percentual de animais com marcação de Imunohistoquímica de Catalase, GSH-Px1, NRF2 e NOX4 no estroma dos grupos Controle, MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA.

Proteínas	Grupos	Componente Marcado (% dos animais)		
		Endotélio	Músculo Liso	Células Inflamatórias
CAT	Controle	100	0	100
	MNU	100	80	100
	MNU+PMAPA	100	100	100
	MNU+TNP470	100	100	100
	MNU+TNP470+PMAPA	100	100	100
GSH-Px1	Controle	100	100	100
	MNU	100	100	100
	MNU+PMAPA	100	100	100
	MNU+TNP470	100	100	100
	MNU+TNP470+PMAPA	100	100	100
NRF2	Controle	20	20	60
	MNU	80	60	100
	MNU+PMAPA	80	60	100
	MNU+TNP470	80	0	80
	MNU+TNP470+PMAPA	100	100	100
NOX4	Controle	100	100	100
	MNU	100	100	100
	MNU+PMAPA	100	100	100
	MNU+TNP470	100	20	100
	MNU+TNP470+PMAPA	100	100	100

Tabela 16. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica de Catalase nas lesões prostáticas dos Grupos MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

CAT		Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
Lesões Prostáticas	Grupos	SN		IN		C				
		PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
PIN	MNU	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+PMAPA	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	3	2	0	0	9
PIA	MNU	0	0	3	1	3	1	0	3	3
	MNU+PMAPA	0	0	0	0	3	1	0	0	3
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	1	0	0	3
AP	MNU+PMAPA	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	3	2	0	0	9
ABG	MNU	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+PMAPA	0	0	0	0	3	1	0	0	3
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	1	0	0	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	3	1	0	0	3
AGI	MNU	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	1	0	0	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	3	1	0	0	3
AAG	MNU	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	1	0	0	3

Tabela 17. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica de GSH-Px1 nas lesões prostáticas dos Grupos MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

GSH-Px1		Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
Lesões Prostáticas	Grupos	SN		IN		C				
		PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
PIN	MNU	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	1	3	2	0	2	9
PIA	MNU	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+PMAPA	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470	0	0	2	2	3	2	0	4	9
		0	0	1	2	3	2	0	1	9
AP	MNU+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
ABG	MNU	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
AGI	MNU	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
AAG	MNU	0	0	1	2	1	1	0	1	1
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	1	0	0	3

Tabela 18. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica de NRF2 nas lesões prostáticas dos Grupos MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

NRF2		Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
Lesões Prostáticas	Grupos	SN		IN		C				
		PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
PIN	MNU	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	1	3	2	0	2	9
PIA	MNU	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	1	0	2	3
AP	MNU+PMAPA	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	2	3	2	0	4	9
ABG	MNU	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+PMAPA	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	1	2	3	2	0	1	9
AGI	MNU	0	0	2	1	3	1	0	2	3
	MNU+TNP470	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	3	1	0	0	3
AAG	MNU	0	0	1	2	1	2	0	1	1
	MNU+TNP470	0	0	2	3	3	3	0	8	27

Tabela 19. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica de NOX4 nas lesões prostáticas dos Grupos MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

NOX4		Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
Lesões Prostáticas	Grupos	SN		IN		C				
		PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
PIN	MNU	0	0	3	3	3	2	0	27	9
	MNU+PMAPA	0	0	2	3	3	2	0	8	9
	MNU+TNP470	0	0	2	3	3	2	0	8	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	3	3	2	0	8	9
PIA	MNU	0	0	3	2	3	2	0	9	9
		0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+PMAPA	0	0	3	1	3	1	0	3	3
	MNU+TNP470	0	0	2	2	3	2	0	4	9
AP	MNU+PMAPA	0	0	2	2	3	1	0	4	3
		0	0	2	3	3	2	0	8	9
	MNU+TNP470	0	0	2	3	3	1	0	8	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	3	3	2	0	8	9
ABG	MNU	0	0	2	3	3	2	0	8	9
	MNU+PMAPA	0	0	2	3	3	2	0	8	9
	MNU+TNP470	0	0	2	2	3	1	0	4	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	2	3	1	0	4	3
AGI	MNU	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470	0	0	2	2	3	1	0	4	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	2	2	3	1	0	4	3
AAG	MNU	0	0	1	3	1	2	0	1	1
	MNU+TNP470	0	0	2	2	3	1	0	4	3

Tabela 20. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica para HIF1 α , VEGF e Endostatina em regiões de epitélio normal dos Grupos: Controle, MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

Proteínas	Grupos	Animais (%)	Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
			SN		IN		C				
			PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
HIF1 α	Controle	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MNU	40	3	3	0	0	3	1	27	0	3
	MNU+PMAPA	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MNU+TNP470	60	3	3	0	0	3	1	27	0	3
	MNU+TNP470+PMAPA	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VEGF	Controle	100	3	3	0	0	3	1	27	0	3
	MNU	40	3	3	0	0	3	1	27	0	3
		40	0	0	0	0	3	1	0	0	3
	MNU+PMAPA	80	3	3	0	0	3	1	27	0	3
	MNU+TNP470	50	0	0	0	0	3	1	0	0	3
	MNU+TNP470+PMAPA	60	3	3	0	0	3	1	27	0	3
Endostatina	Controle	80	3	1	0	0	0	0	3	0	0
	MNU	40	0	0	0	0	3	2	0	0	9
		40	0	0	0	0	3	1	0	0	3
	MNU+PMAPA	60	3	2	0	0	3	1	9	0	3
	MNU+TNP470	50	3	2	0	0	3	1	9	0	3
	MNU+TNP470+PMAPA	40	0	0	0	0	3	3	0	0	27

Tabela 21. Percentual de animais com marcação de Imunohistoquímica para HIF1 α , VEGF e Endostatina no estroma dos grupos Controle, MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA.

Proteínas	Grupos	Componente Marcado (% dos animais)		
		Endotélio	Músculo Liso	Células Inflamatórias
HIF1 α	Controle	60	0	40
	MNU	60	60	80
	MNU+PMAPA	0	0	100
	MNU+TNP470	75	75	50
	MNU+TNP470+PMAPA	20	20	80
VEGF	Controle	60	0	40
	MNU	20	20	100
	MNU+PMAPA	80	80	60
	MNU+TNP470	0	25	100
	MNU+TNP470+PMAPA	60	80	80
Endostatina	Controle	60	0	40
	MNU	100	60	40
	MNU+PMAPA	100	80	80
	MNU+TNP470	75	50	50
	MNU+TNP470+PMAPA	100	40	100

Tabela 22. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica de HIF1 α nas lesões prostáticas dos Grupos MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

HIF1 α		Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
Lesões Prostáticas	Grupos	SN		IN		C				
		PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
PIN	MNU	3	3	0	0	3	2	27	0	9
	MNU+PMAPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	2	0	0	9
		3	3	0	0	3	1	27	0	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PIA	MNU	0	0	1	2	3	1	0	1	3
		0	0	1	2	3	2	0	1	9
	MNU+PMAPA	0	0	0	0	1	1	0	0	1
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	2	0	0	9
AP	MNU+PMAPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MNU+TNP470	0	0	2	3	3	2	0	8	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ABG	MNU	3	3	0	0	3	2	27	0	9
	MNU+PMAPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MNU+TNP470	0	0	1	2	3	3	0	1	27
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AGI	MNU	0	0	1	2	3	2	0	1	9
		0	0	2	3	3	3	0	8	27
	MNU+TNP470	0	0	2	3	3	3	0	8	27
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAG	MNU	0	0	1	2	2	1	0	1	2
	MNU+TNP470	0	0	1	2	3	2	0	1	9

Tabela 23. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica de VEGF nas lesões prostáticas dos Grupos MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

VEGF		Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
Lesões Prostáticas	Grupos	SN		IN		C				
		PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
PIN	MNU	3	3	0	0	3	2	27	0	9
		0	0	0	0	3	3	0	0	27
	MNU+PMAPA	3	2	0	0	3	1	9	0	3
		0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	1	0	0	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	3	2	0	0	9
PIA	MNU	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+PMAPA	0	0	0	0	3	1	0	0	3
		3	3	0	0	3	2	27	0	9
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	1	0	0	3
AP	MNU+PMAPA	0	0	2	3	3	3	0	8	27
	MNU+TNP470	3	3	0	0	3	1	27	0	3
	MNU+TNP470+PMAPA	3	3	0	0	3	2	27	0	9
ABG	MNU	0	0	2	3	3	3	0	8	27
	MNU+PMAPA	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	3	2	0	0	9
		0	0	0	0	3	3	0	0	27
AGI	MNU	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	1	0	0	3
		0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	1	3	3	3	0	1	27
AAG	MNU	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	1	0	0	3

Tabela 24. Padrões predominantes de marcação de Imunohistoquímica de Endostatina nas lesões prostáticas dos Grupos MNU, MNU+PMAPA, MNU+TNP470 e MNU+TNP470+PMAPA com suas respectivas notas conforme cada compartimento. PCM (percentual de células marcadas), Int (intensidade), SN (compartimento supranuclear), IN (compartimento intranuclear) e C (compartimento citoplasmático).

Endostatina		Compartimentos						Valor da Nota por Compartimento		
Lesões Prostáticas	Grupos	SN		IN		C				
		PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	SN	IN	C
PIN	MNU	3	2	0	0	3	1	9	0	3
		3	3	0	0	3	1	27	0	3
	MNU+PMAPA	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	3	1	0	0	3
PIA	MNU	0	0	0	0	3	1	0	0	3
	MNU+PMAPA	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	1	0	0	3
AP	MNU+PMAPA	0	0	0	0	3	1	0	0	3
		0	0	0	0	3	2	0	0	9
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	1	0	0	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	3	3	0	0	27
ABG	MNU	0	0	1	1	3	1	0	1	3
	MNU+PMAPA	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470	0	0	2	2	3	2	0	4	9
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	3	3	0	0	27
AGI	MNU	2	2	0	0	3	1	4	0	3
		3	3	0	0	3	1	27	0	3
		3	3	0	0	3	2	27	0	9
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	1	0	0	3
	MNU+TNP470+PMAPA	0	0	0	0	3	2	0	0	9
AAG	MNU	0	0	0	0	3	1	0	0	3
	MNU+TNP470	0	0	0	0	3	2	0	0	9

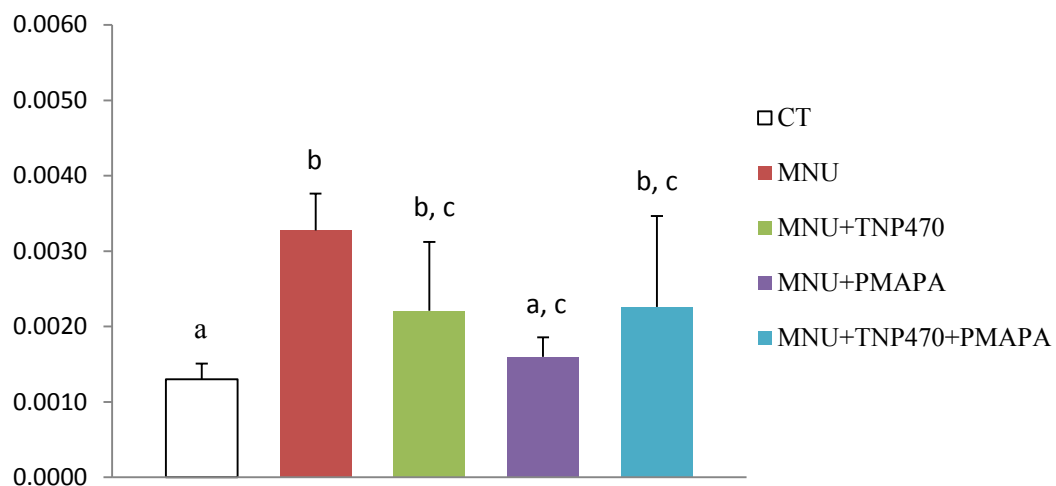


Figura 1. Gráfico da relação peso do lobo ventral da próstata em relação ao peso corporal dos animais. Legenda: (a) estatisticamente igual ao controle; (b) estatisticamente igual ao MNU; (c) estatisticamente igual ao MNU+PMAPA, com $p \leq 0,05$.

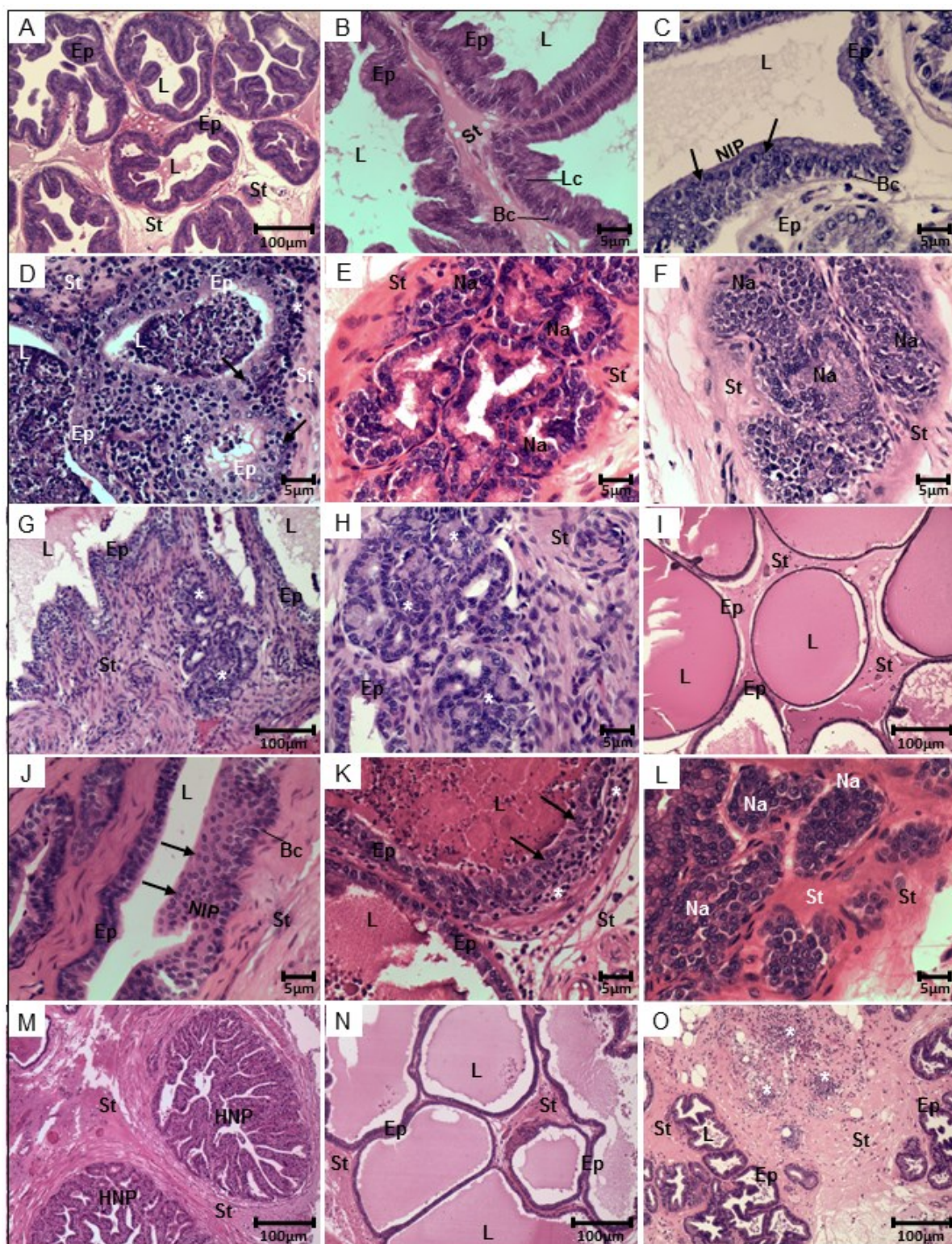


Figura 2. Fotomicrografias do lobo ventral prostático dos grupos Controle (a, b), MNU (c, d, e, f, g, h), MNU+TNP470 (i, j, k, l) e MNU+PMAPA (m, n, o). (a), (b) Ácinos de diferentes tamanhos com borda pregueada e epitélio secretor composto por uma camada de células basais (**Bc**) e uma camada de células colunares secretoras (**Lc**). (c), (j) Neoplasia intraepitelial prostática (**HGPIIN**) caracterizada por proliferação epitelial focal com atipias citológicas

como núcleos volumosos e nucléolos proeminentes de intensidade variável (**setas**). (d), (k) Atrofia inflamatória proliferativa (PIA) caracterizada por ácinos atróficos com epitélio displásico, apresentando mais de uma camada de células de morfologia atípica (**setas**), acompanhada de infiltrado inflamatório intersticial periacinar (**asteriscos**) predominantemente linfocitário. (e) Adenocarcinoma prostático de baixo grau constituído por ácinos neoplásicos (**Na**) discretos, bem-formados, com núcleos volumosos e nucléolos proeminentes; ausência das células epiteliais basais. (f), (l) Adenocarcinoma prostático de grau intermediário caracterizado por ácinos neoplásicos (**Na**) pontiagudos fundidos; ausência da camada de células epiteliais basais. (g), (h) Adenocarcinoma prostático de alto grau caracterizado por rara formação acinar, com células neoplásicas dispostas em cordões ou ninhos (**asteriscos**) dispersas no estroma. (i), (n) Atrofia prostática caracterizada por ácinos com mucosa pouco pregueada; epitélio secretor constituído por células secretoras de formato cuboide, além de células basais. (m) Hiperplasia Nodular Prostática (**HNP**) constituída por nódulos hiperplásicos estrômato-glandulares bem delimitados, caracterizados por ácinos apresentando lado externo reto e lado interno mostrando epitélio com papilomatose; epitélio dos ácinos glandulares revestido por células colunares secretoras e células basais. (o) Infiltrado inflamatório (**asteriscos**) intersticial disperso no estroma prostático. a – h: **Ep** – epitélio, L – lúmen, **St** – estroma.

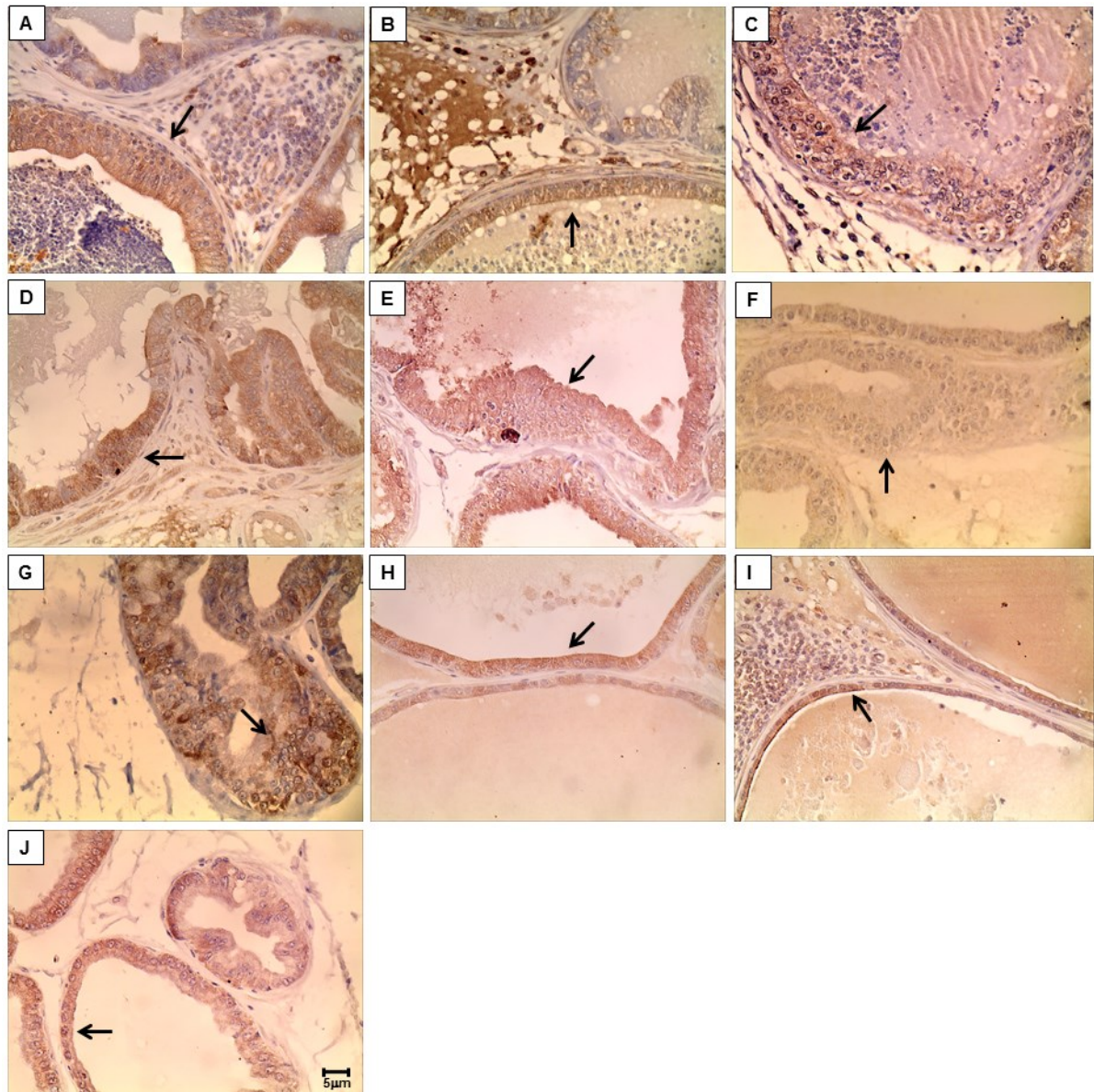


Figura 3. Imunohistoquímica para TLR4. Grupos: MNU (A,D), MNU+PMAPA (B,E,H), MNU+TNP470 (C,F,I), MNU+PMAPA+TNP470 (G,J). (A) PIA $1^1=1$ IN, $3^2=9$ C; (B) PIA $1^1=1$ IN, $3^2=9$ C; (C) PIA $1^1=1$ IN, $3^1=3$ C; (D) PIN $1^2=1$ IN, $3^2=9$ C; (E) PIN $1^1=1$ IN, $3^3=27$ C; (F) PIN $1^1=1$ IN, $3^1=3$ C; (G) PIN $1^2=1$ IN, $2^3=8$ C; (H) AP $1^1=1$ IN, $3^2=9$ C; (I) AP $1^1=1$ IN, $3^1=3$ C; (J) AP $1^1=1$ IN, $3^2=9$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

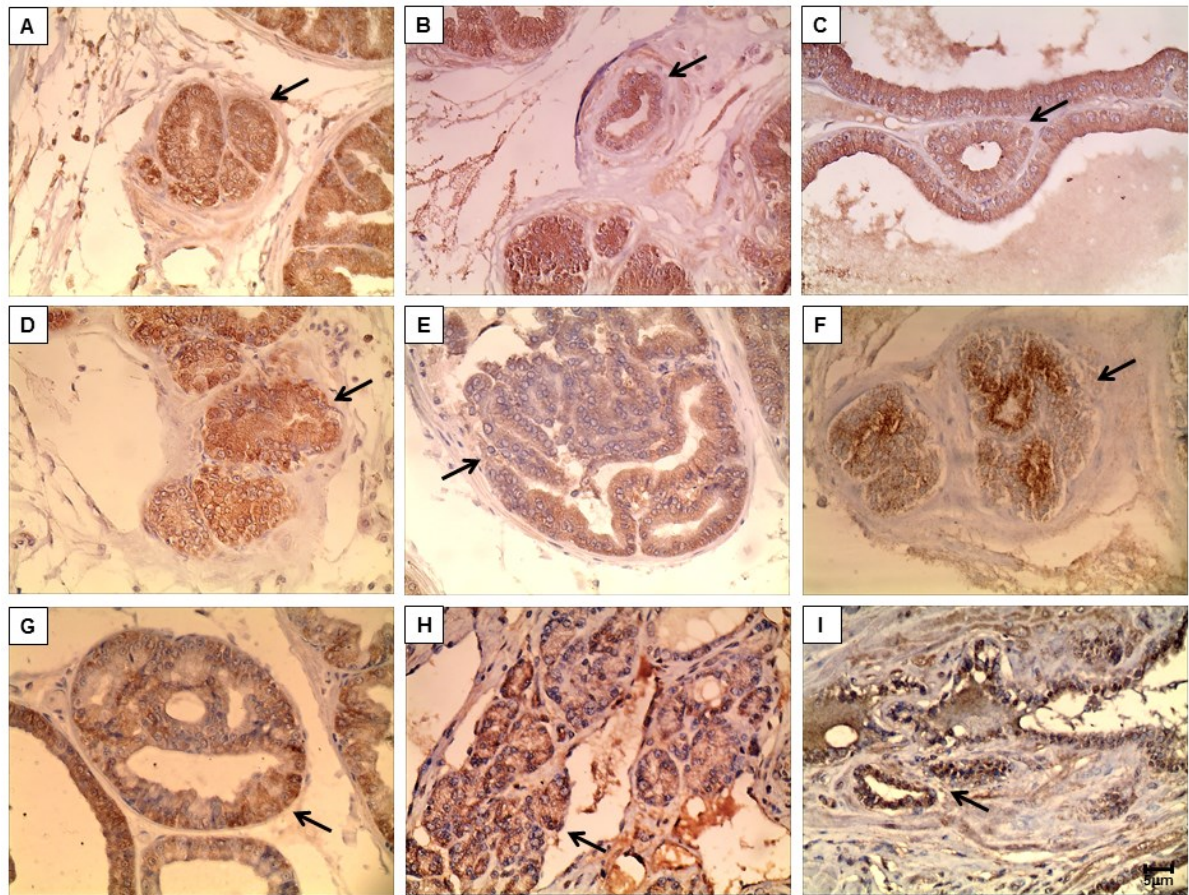


Figura 4. Imunohistoquímica para TLR4. Grupos: MNU (A,E,H), MNU+PMAPA (B), MNU+TNP470 (C,F,I), MNU+PMAPA+TNP470 (D,G). (A) ABG $1^1=1$ IN, $3^2=9$ C; (B) ABG $1^1=1$ IN, $3^2=9$ C; (C) ABG $1^1=1$ IN, $3^2=9$ C; (D) ABG $1^1=1$ IN, $3^2=9$ C; (E) AGI $1^1=1$ IN, $3^2=9$ C; (F) AGI $1^1=1$ IN, $3^2=9$ C; (G) AGI $1^1=1$ IN, $2^2=4$ C; (H) AAG $1^2=1$ IN, $2^3=8$ C; (I) AAG $1^3=1$ IN, $3^3=27$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

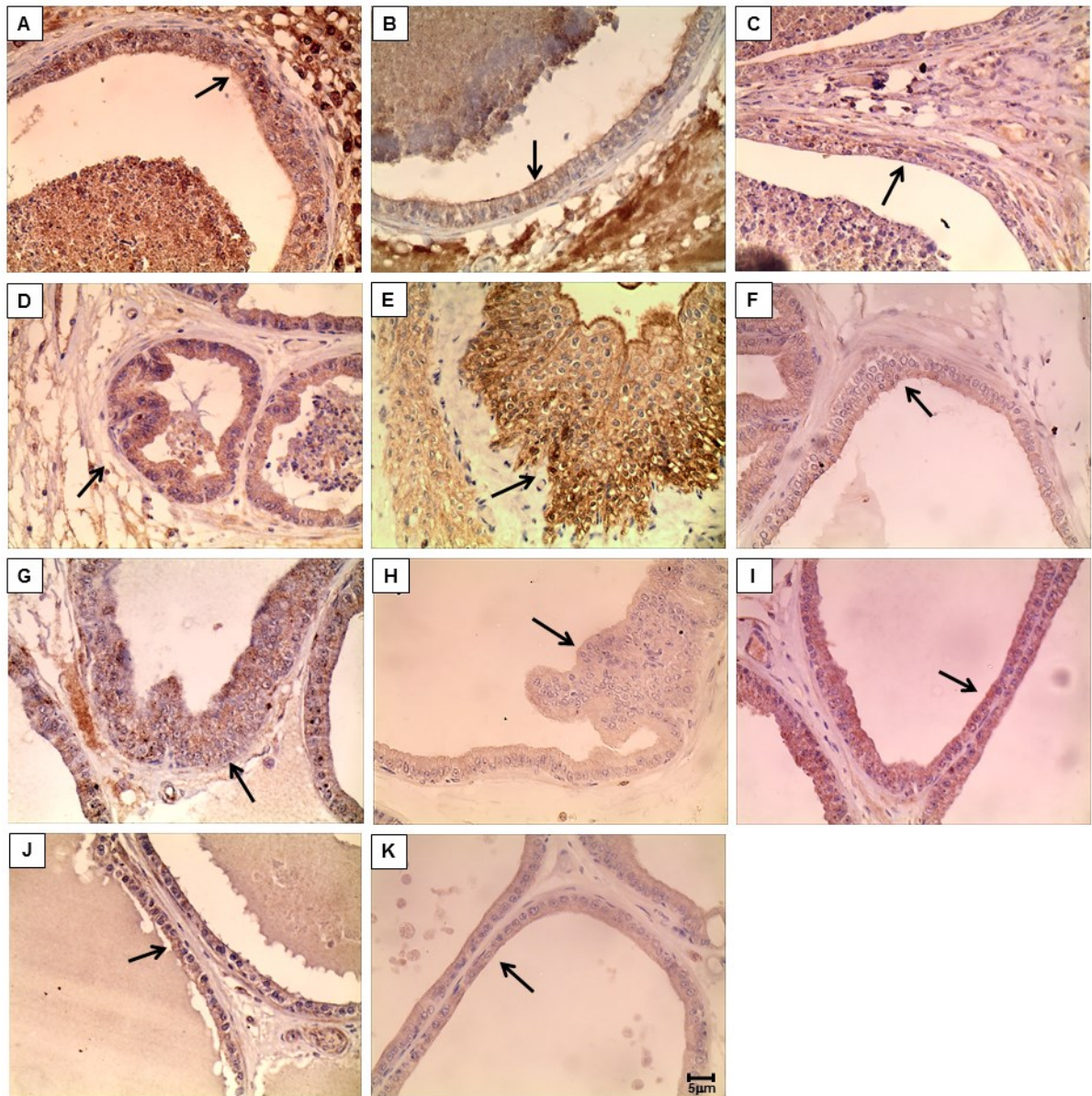


Figura 5. Imunohistoquímica para NFkB. Grupos: MNU (A,D,E), MNU+PMAPA (B,F,I), MNU+TNP470 (C,G,J), MNU+PMAPA+TNP470 (H,K). (A) PIA $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (B) PIA $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (C) PIA $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (D) PIN $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (E) PIN $2^3=8$ IN, $3^3=27$ C; (F) PIN $3^1=3$ C; (G) PIN $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (H) PIN $3^1=3$ IN, $3^1=3$ C; (I) AP $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (J) AP $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (K) AP $2^1=2$ IN, $3^2=9$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

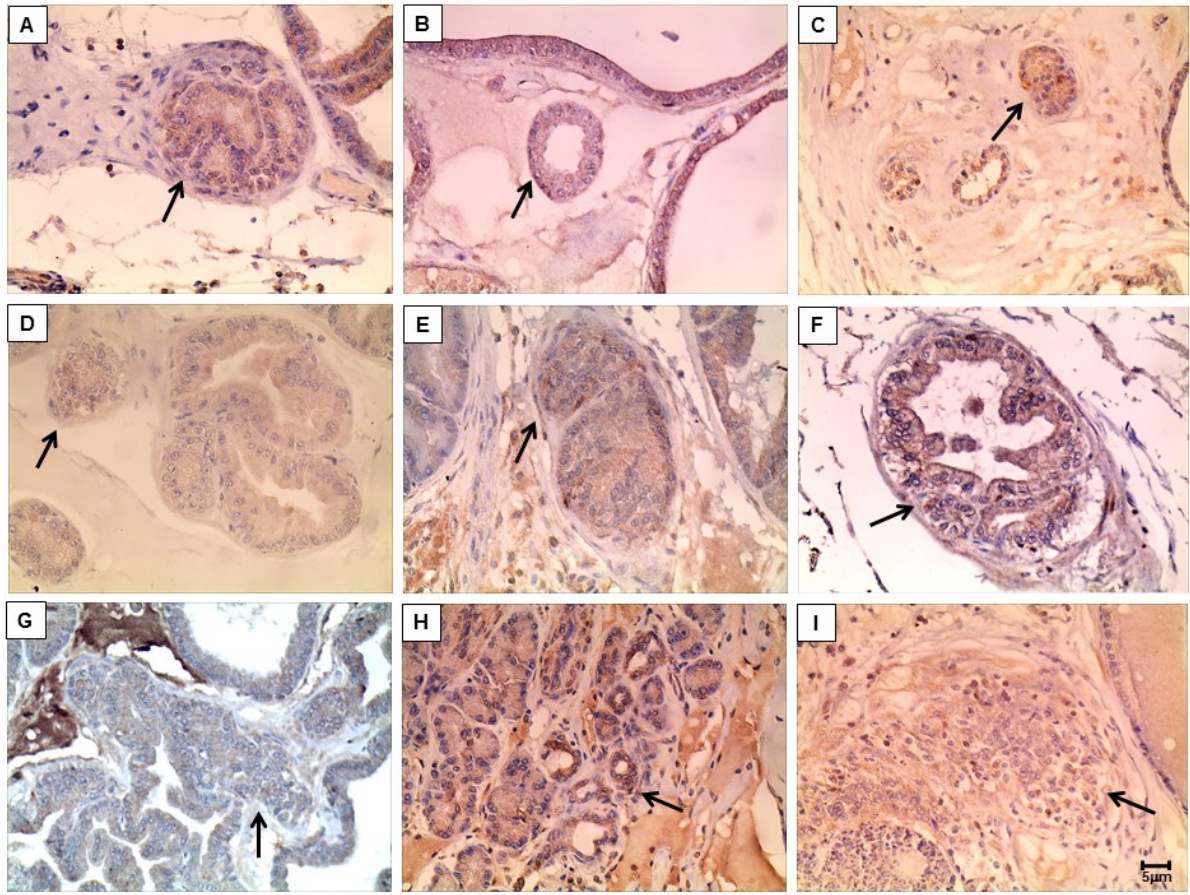


Figura 6. Imunohistoquímica para NFκB. Grupos: MNU (A,E,H), MNU+PMAPA (B), MNU+TNP470 (C,F), MNU+PMAPA+TNP470 (D,G). (A) ABG $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (B) ABG $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (C) ABG $2^1=2$ IN, $3^2=9$ C; (D) ABG $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (E) AGI $3^1=3$ IN, $3^2=9$ C; (F) AGI $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (G) AGI $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (H) AAG $2^2=4$ IN, $2^3=8$ C; (I) AAG $3^1=3$ IN, $3^1=3$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

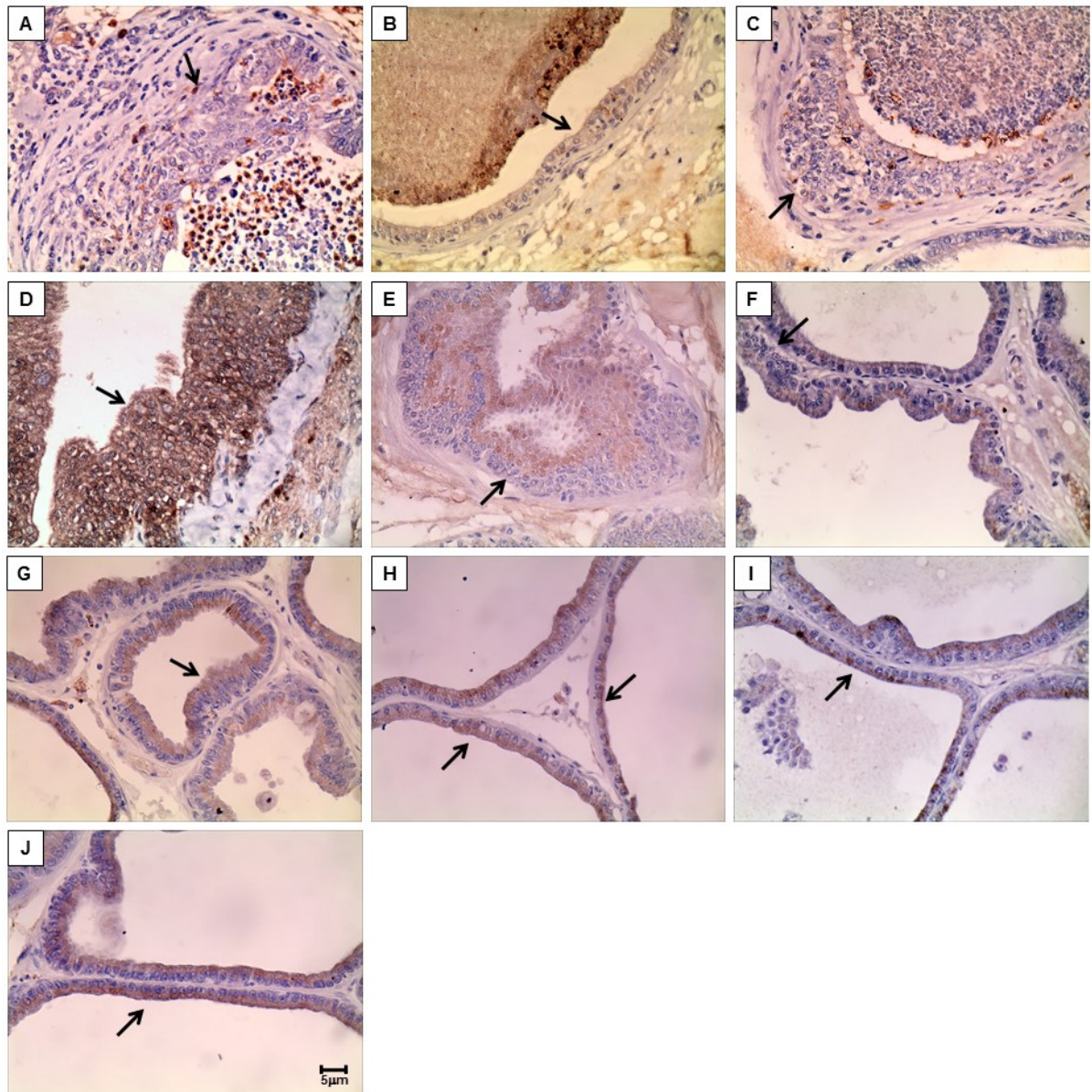


Figura 7. Imunohistoquímica para $TNF\alpha$. Grupos: MNU (A,D), MNU+PMAPA (B,E,H), MNU+TNP470 (C,F,I), MNU+PMAPA+TNP470 (G,J). (A) PIA $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (B) PIA $3^1=3$ C; (C) PIA $3^1=3$ C; (D) PIN $2^3=8$ IN, $3^3=27$ C; (E) PIN $3^2=9$ C; (F) PIN $3^2=9$ C; (G) PIN $3^2=9$ C; (H) AP $3^2=9$ C; (I) AP $3^2=9$ C; (J) AP $3^2=9$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

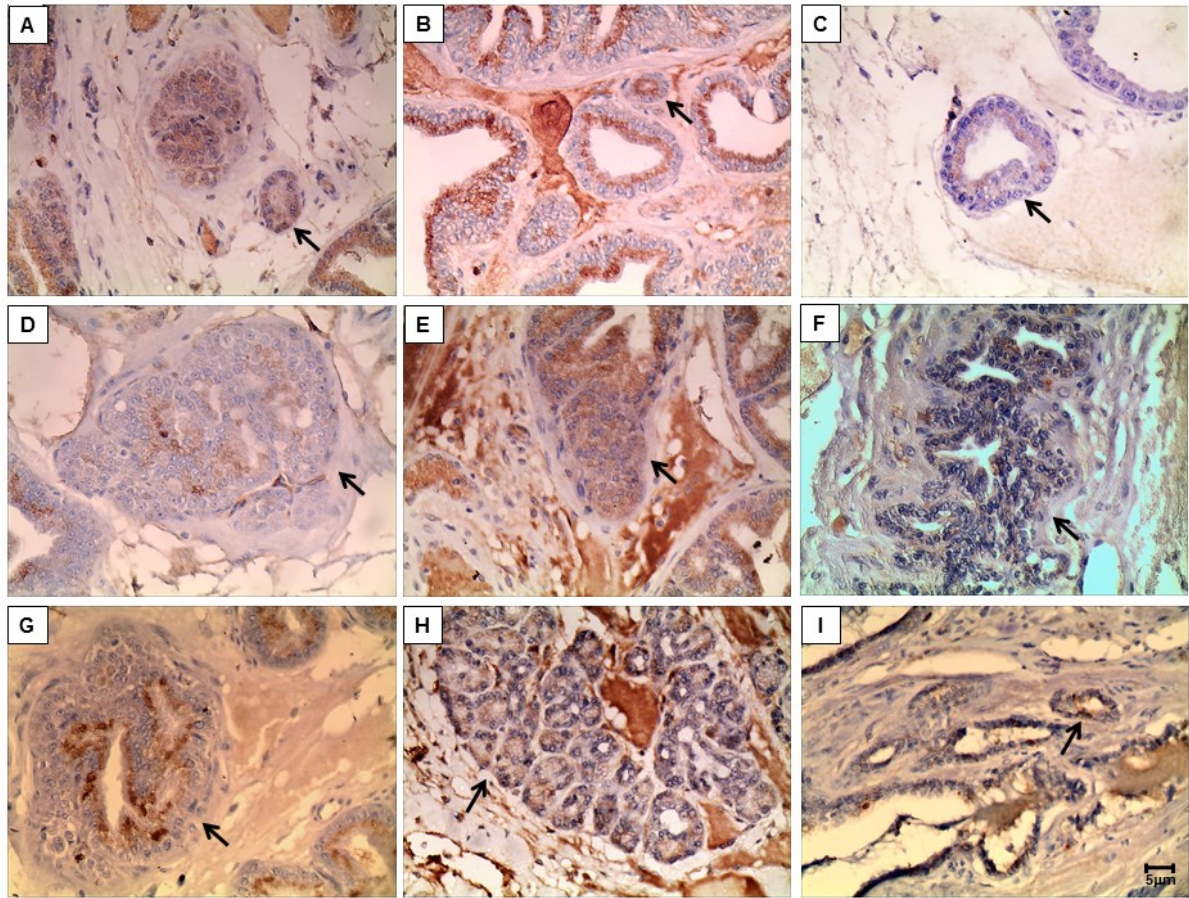


Figura 8. Imunohistoquímica para $TNF\alpha$. Grupos: MNU (A,E,H), MNU+PMA (B), MNU+TNF470 (C,F,I), MNU+PMA+TNF470 (D,G). (A) ABG $3^1=3$ IN, $3^1=3$ C; (B) ABG $3^2=9$ C; (C) ABG $3^1=3$ C; (D) ABG $3^1=3$ C; (E) AGI $3^1=3$ IN, $3^2=9$ C; (F) AGI $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (G) AGI $3^2=9$ C; (H) AAG $3^1=3$ IN, $3^2=9$ C; (I) AAG $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

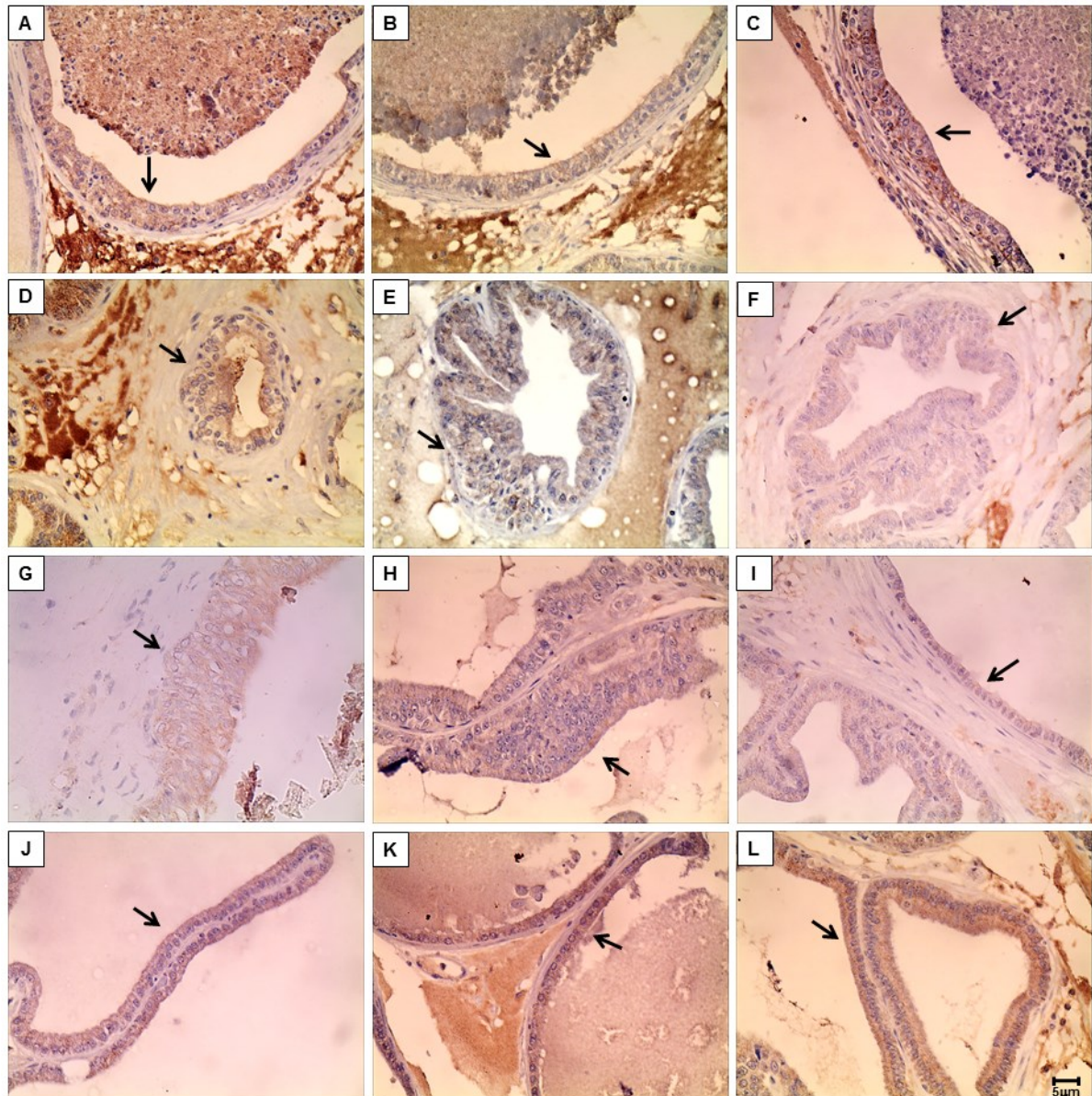


Figura 9. Imunohistoquímica para IL6. Grupos: MNU (A,D), MNU+PMAPA (B,E,F,I,J), MNU+TNP470 (C,G,K), MNU+PMAPA+TNP470 (H,L). (A) PIA $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (B) PIA $3^1=3$ C; (C) PIA $3^1=3$ C; (D) PIN $3^2=9$ C; (E) PIN $3^2=9$ IN, $3^2=9$ C; (F) PIN $3^1=3$ IN, $3^1=3$ C; (G) PIN $3^1=3$ C; (H) PIN $3^1=3$ C; (I) AP $3^1=3$ IN, $3^1=3$ C; (J) AP $3^2=9$ IN, $3^2=9$ C; (K) AP $3^2=9$ IN, $3^2=9$ C; (L) AP $3^1=3$ IN, $3^2=9$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

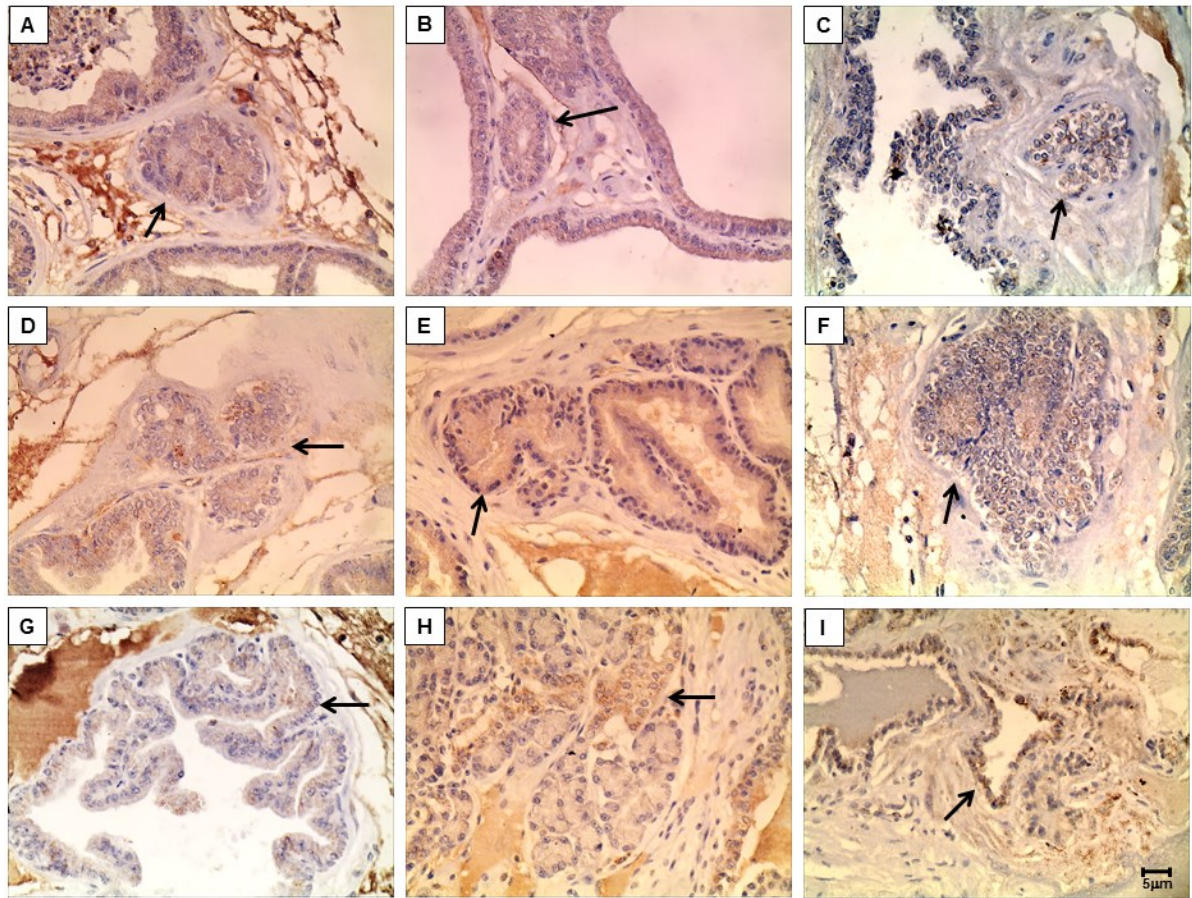


Figura 10. Imunohistoquímica para IL6. Grupos: MNU (A,E,H), MNU+PMAPA (B), MNU+TNP470 (C,F), MNU+PMAPA+TNP470 (D,G). (A) ABG $3^1=3$ IN, $3^1=3$ C; (B) ABG $3^1=3$ IN, $3^1=3$ C; (C) ABG $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (D) ABG $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (E) AGI $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (F) AGI $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (G) AGI $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (H) AAG $1^1=1$ IN, $3^1=3$ C; (I) AAG $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

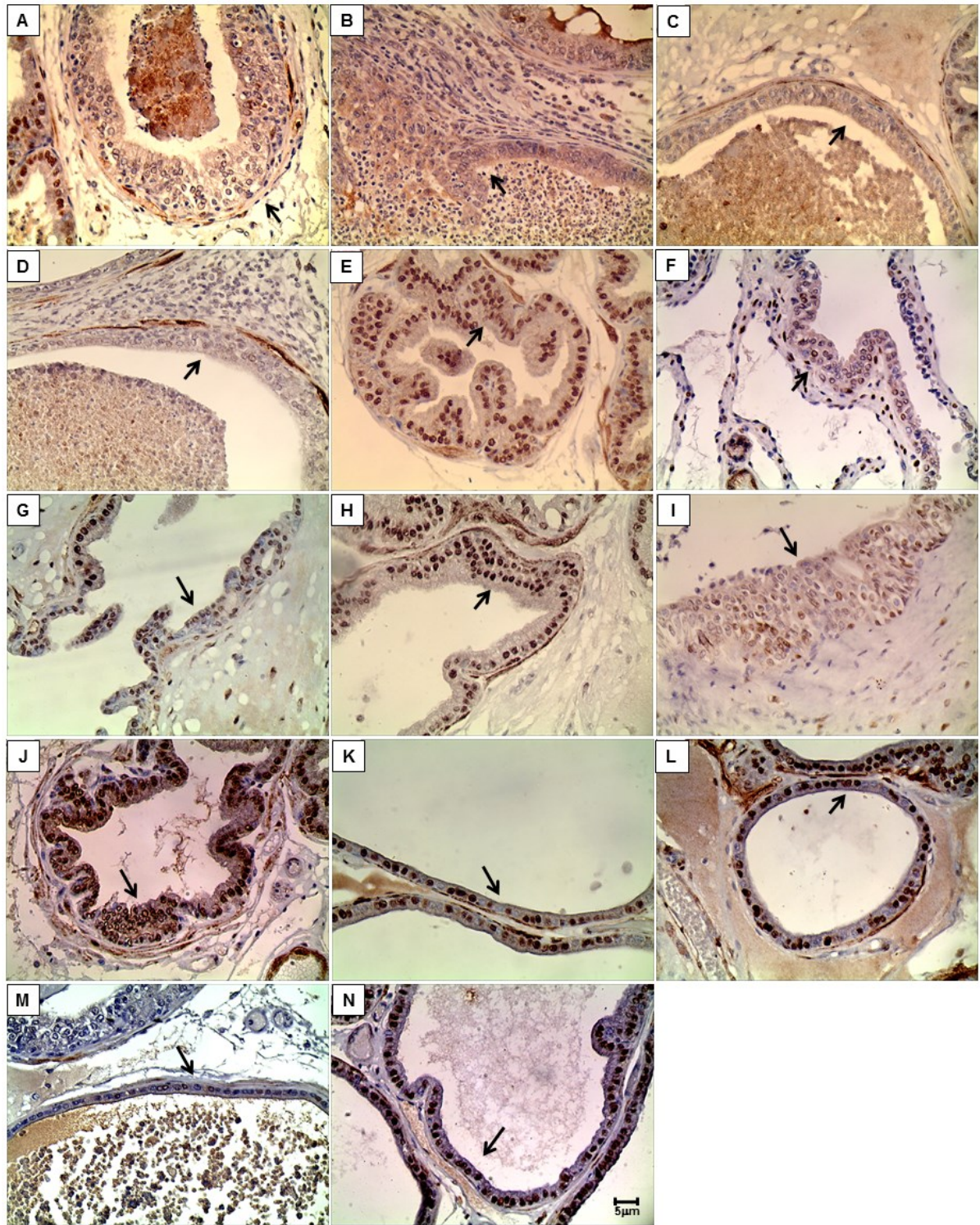


Figura 11. Imunohistoquímica de próstata para AR. Grupos: MNU (A,B,E,F), MNU+PMAPA (C,G,H,K), MNU+TNP470 (D,I,L), MNU+PMAPA+TNP470 (J,M,N). (A) PIA $2^2=4$ IN, $3^1=3$ C; (B) PIA $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (C) PIA $3^1=3$ IN, $3^1=3$ C; (D) PIA $2^1=2$ IN; (E) PIN $3^3=27$ IN, $3^1=3$ C; (F) PIN $2^2=4$ IN, $3^1=3$ C; (G) PIN $2^2=4$ IN; (H) PIN $3^3=27$ IN; (I) PIN $2^2=4$ IN, $3^1=3$ C; (J) PIN $3^3=27$ IN; (K) AP $2^3=8$ IN; (L) AP $2^3=8$ IN; (M) AP $2^2=4$ IN; (N) AP $2^3=8$ IN. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

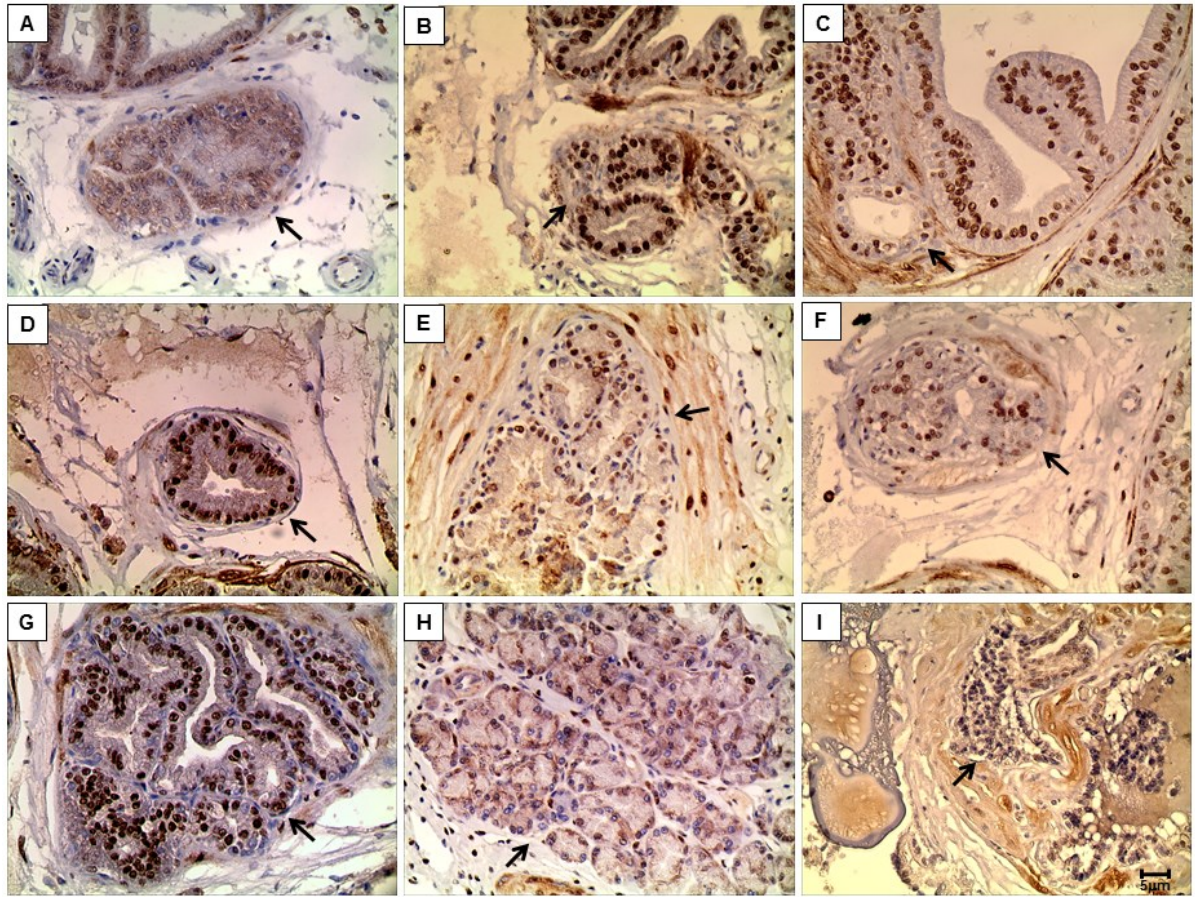


Figura 12. Imunohistoquímica para AR. Grupos: MNU (A,E,H), MNU+PMAPA (B), MNU+TNP470 (C,F,I), MNU+PMAPA+TNP470 (D,G). (A) ABG $2^2=4$ IN, $3^1=3$ C; (B) ABG $2^3=8$ IN; (C) ABG $2^3=8$ IN; (D) ABG $3^3=27$ IN; (E) AGI $2^2=4$ IN, $3^1=3$ C; (F) AGI $2^2=4$ IN ; (G) AGI $2^3=8$ IN; (H) AAG $2^2=4$ IN, $3^1=3$ C; (I) AAG $2^2=4$ IN, $3^1=3$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

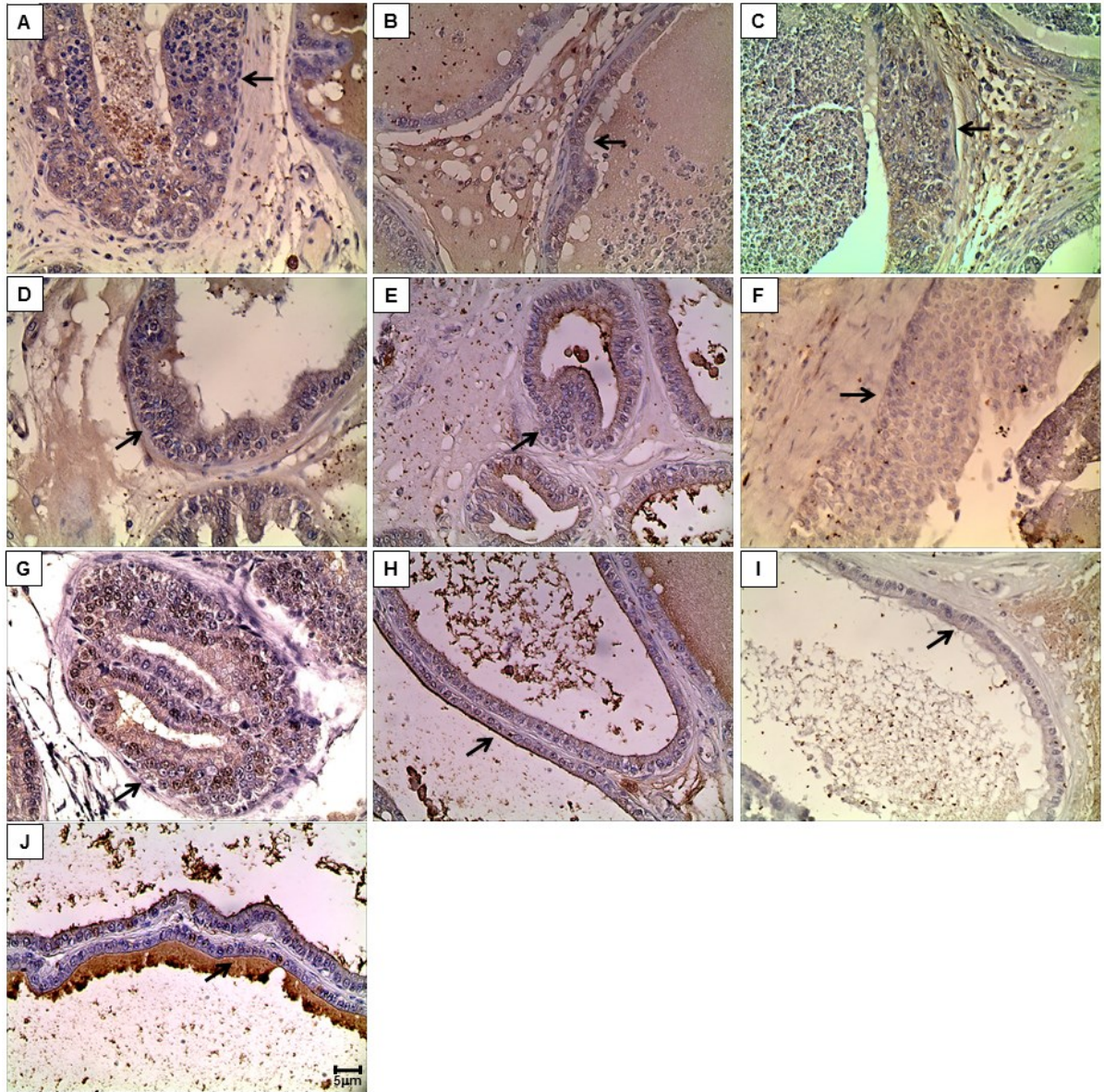


Figura 13. Imunohistoquímica para ER α . Grupos: MNU (A,D), MNU+PMAPA (B,E,H), MNU+TNP470 (C,F,I), MNU+PMAPA+TNP470 (G,J). (A) PIA 2¹=2 IN, 3¹=3 C; (B) PIA 2¹=2 IN, 3¹=3 C; (C) PIA 2¹=2 IN, 3¹=3 C; (D) PIN 2²=4 IN, 3²=9 C; (E) PIN 1²=1 IN, 3¹=3 C; (F) PIN 1¹=1 IN, 3¹=3 C; (G) PIN 2²=4 IN, 3¹=3 C; (H) AP 2¹=2 IN, 3¹=3 C; (I) AP 2¹=2 IN, 3¹=3 C; (J) AP 1²=1 IN. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

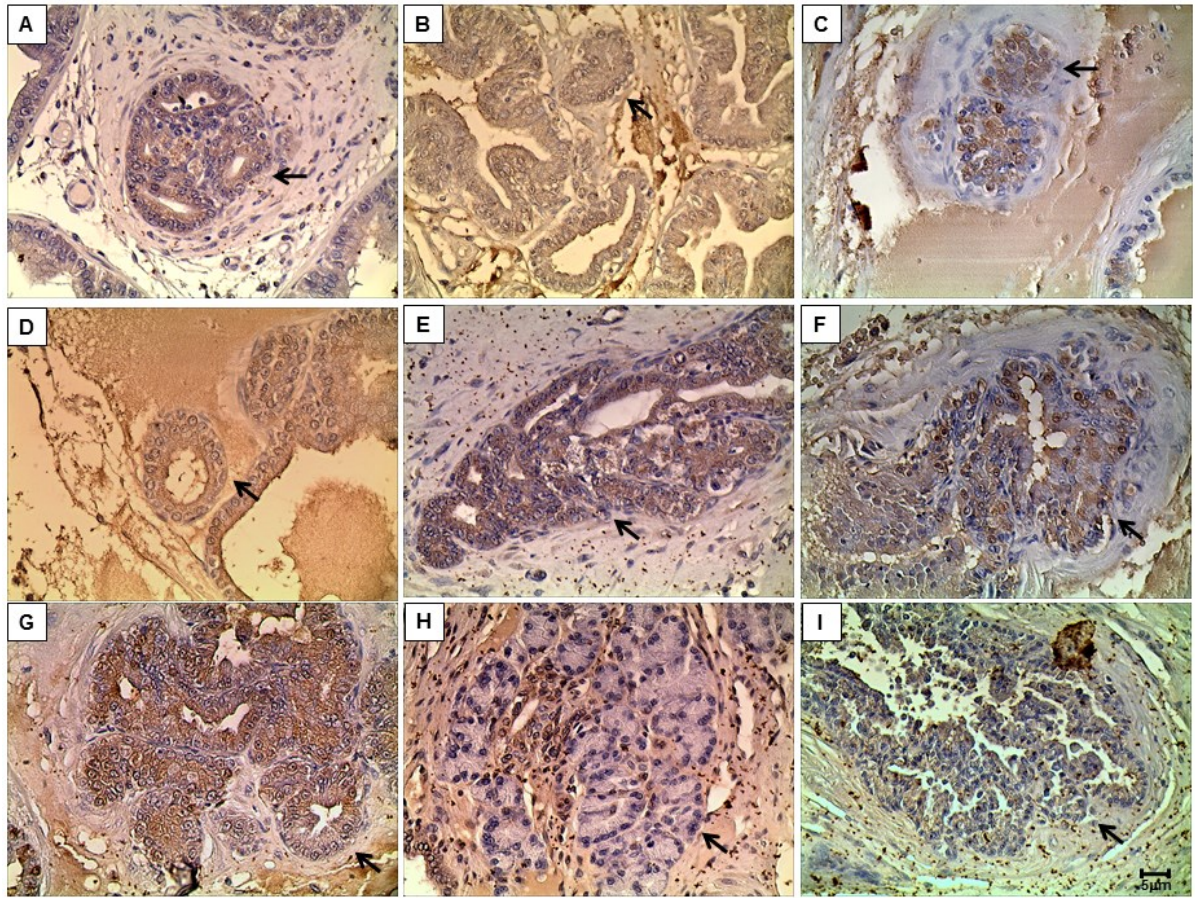


Figura 14. Imunohistoquímica para ER α . Grupos: MNU (A,E,H), MNU+PMAPA (B), MNU+TNP470 (C,F,I), MNU+PMAPA+TNP470 (D,G). (A) ABG 2¹=2 IN, 3¹=3 C; (B) ABG 2¹=2 IN, 3¹=3 C; (C) ABG 2¹=2 IN, 3¹=3 C; (D) ABG 2¹=2 IN, 3¹=3 C; (E) AGI 2²=4 IN, 3²=9 C; (F) AGI 2²=4 IN, 3²=9 C; (G) AGI 2²=4 IN, 3¹=3 C; (H) AAG 1²=1 IN, 1²=1 C; (I) AAG 2¹=2 IN, 3¹=3 C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

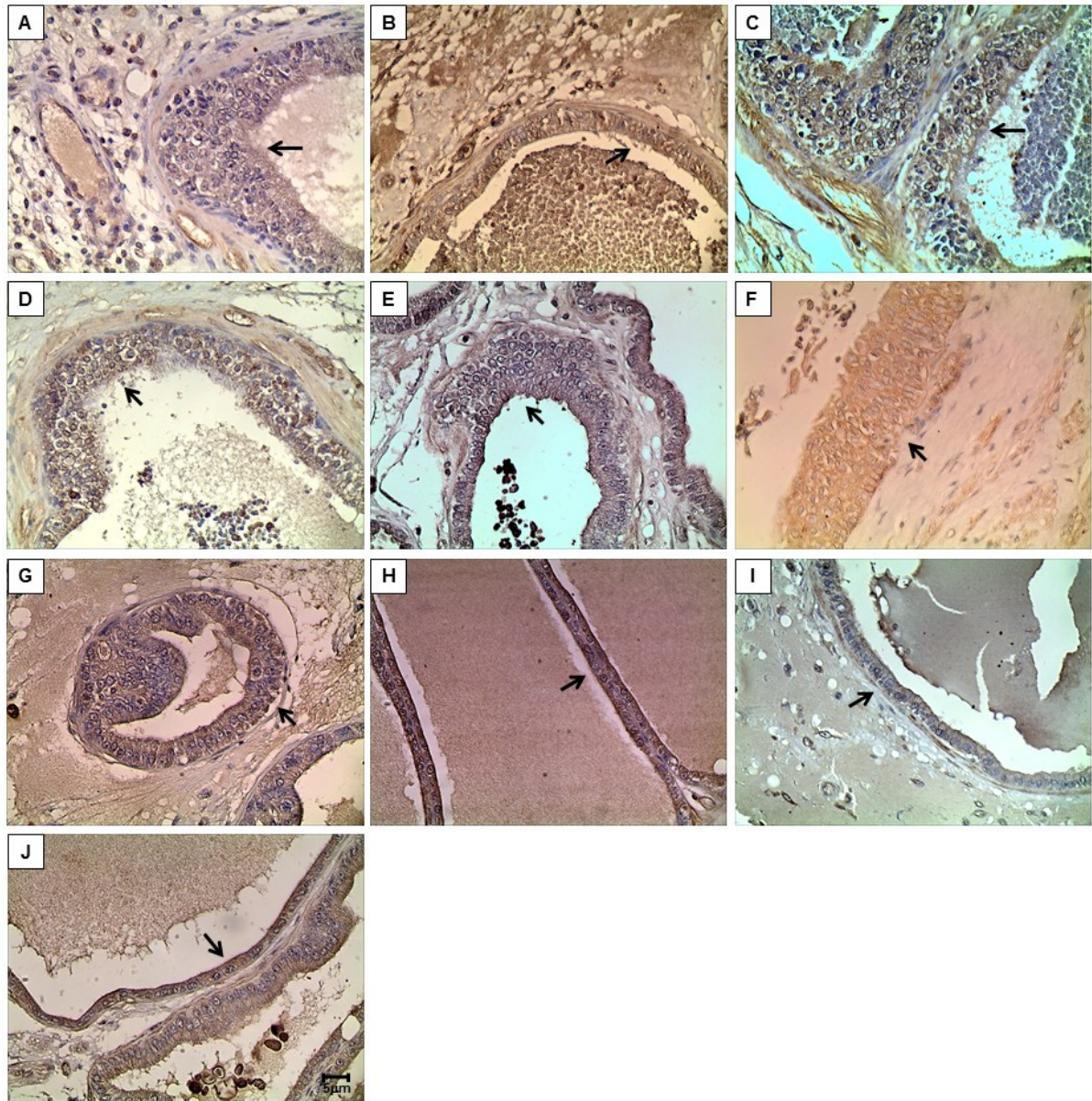


Figura 15. Imunohistoquímica para ER β . Grupos: MNU (A,D), MNU+PMAPA (B,E,H), MNU+TNP470 (C,F,I), MNU+PMAPA+TNP470 (G,J). (A) PIA 2¹=2 IN, 3¹=3 C; (B) PIA 2¹=2 IN, 3¹=3 C; (C) PIA 2¹=2 IN, 3¹=3 C; (D) PIN 2²=4 IN, 3²=9 C; (E) PIN 2²=4 IN, 3²=9 C; (F) PIN 2¹=2 IN, 3²=9 C; (G) PIN 1¹=1 IN, 3²=9 C; (H) AP 2²=4 IN, 3²=9 C; (I) AP 2²=4 IN, 3²=9 C; (J) AP 2²=4 IN, 3²=9 C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

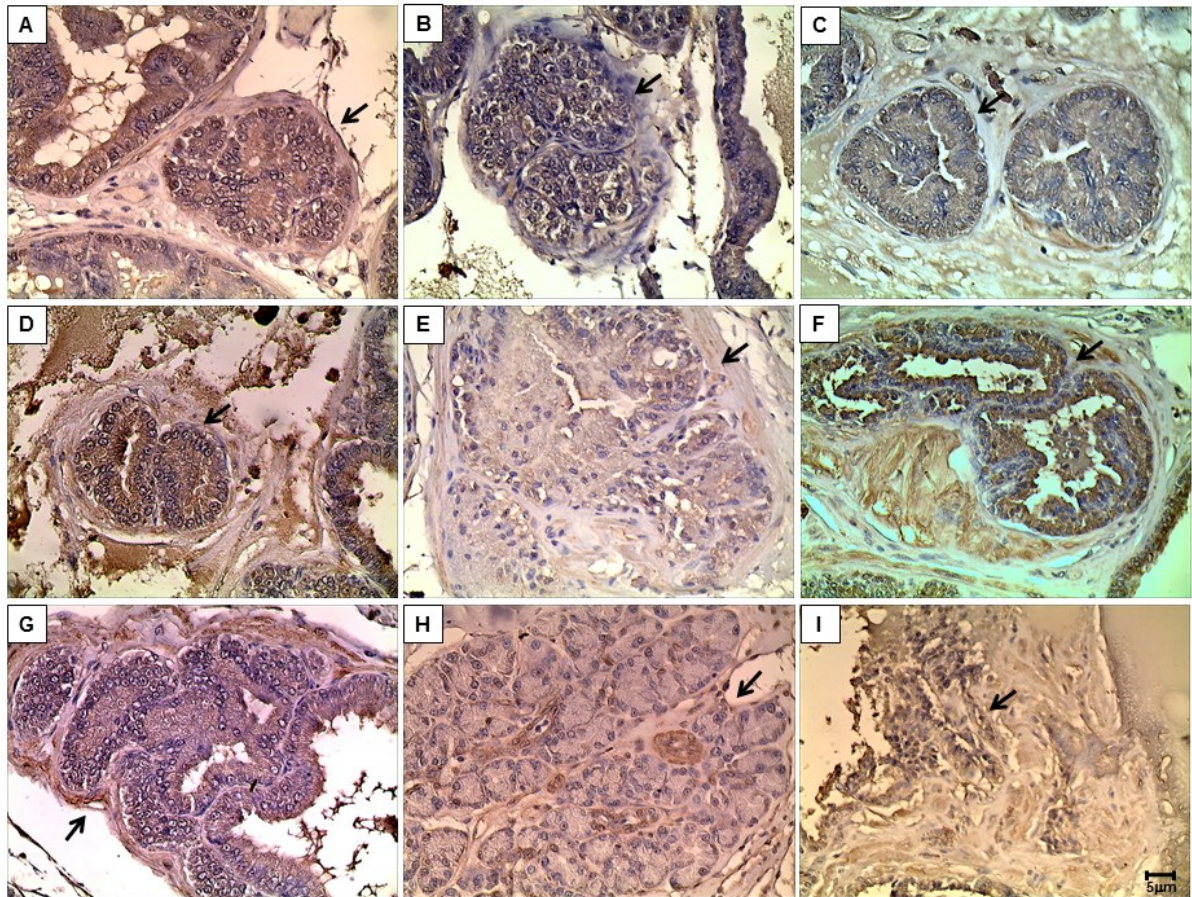


Figura 16. Imunohistoquímica de próstata para ER β . Grupos: MNU (A,E,H), MNU+MAPA (B), MNU+TNP470 (C,F,I), MNU+PMAPA+TNP470 (D,G). (A) ABG 1¹=1 IN, 3¹=3 C; (B) ABG 2¹=2 IN, 3¹=3 C; (C) ABG 2¹=2 IN, 3²=9 C; (D) ABG 1²=1 IN, 3²=9 C; (E) AGI 1¹=1 IN, 3¹=3 C; (F) AGI 1³=1 IN, 3³=27 C; (G) AGI 1¹=1 IN, 3¹=3 C; (H) AAG 1²=1 IN, 1²=1 C; (I) AAG 1¹=1 IN, 3¹=3 C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

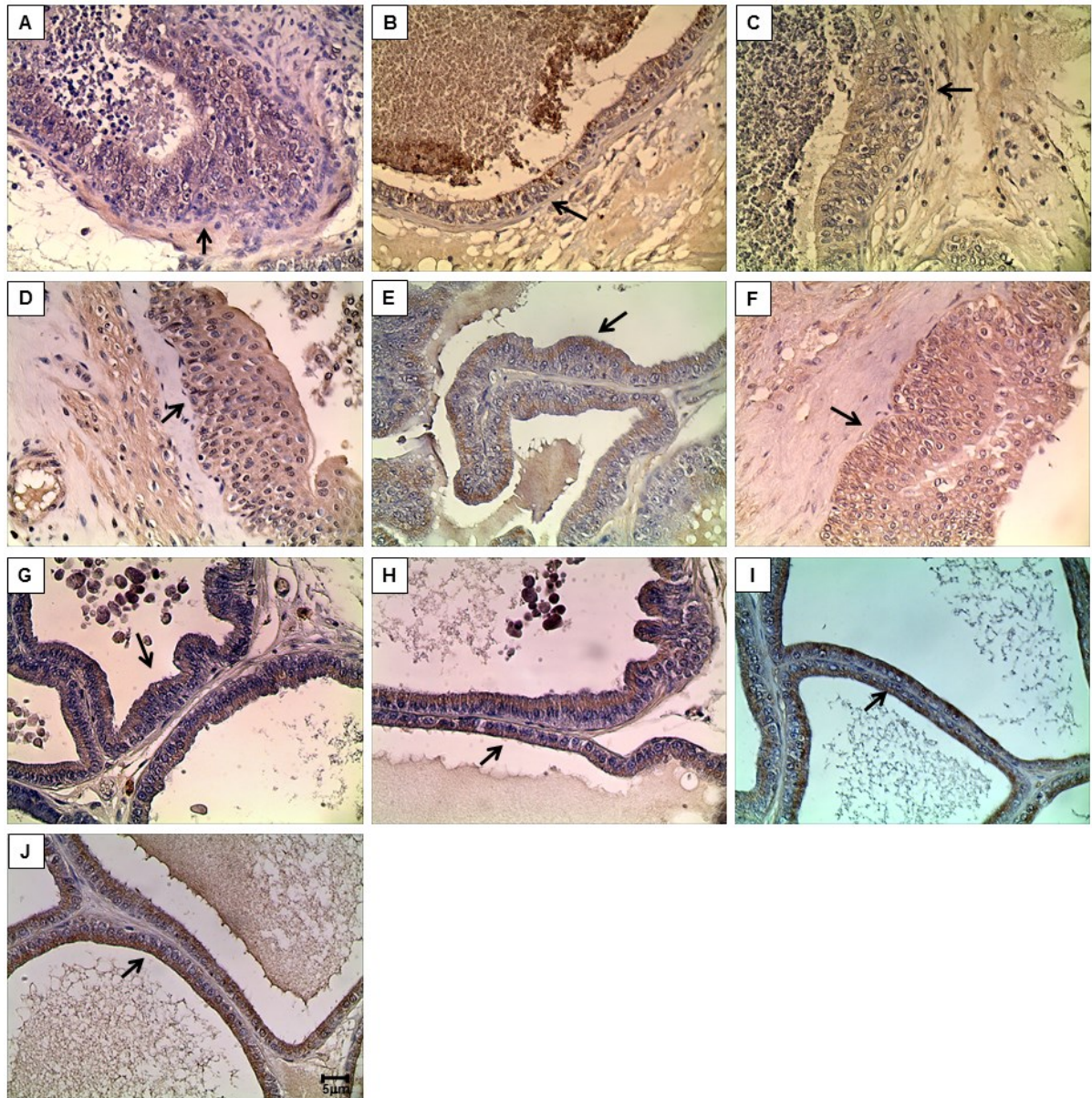


Figura 17. Imunohistoquímica de próstata para Catalase. Grupos: MNU (A,D), MNU+PMAPA (B,E,I), MNU+TNP470 (C,F,J), MNU+PMAPA+TNP470 (G,K). (A) PIA $3^1=3$ IN, $3^1=3$ C; (B) PIA $3^1=3$ C; (C) PIA $3^1=3$ C; (D) PIN $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (E) PIN $3^2=9$ C; (F) PIN $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (G) PIN $3^2=9$ C; (H) AP $3^2=9$ C; (I) AP $3^2=9$ C; (J) AP $3^2=9$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

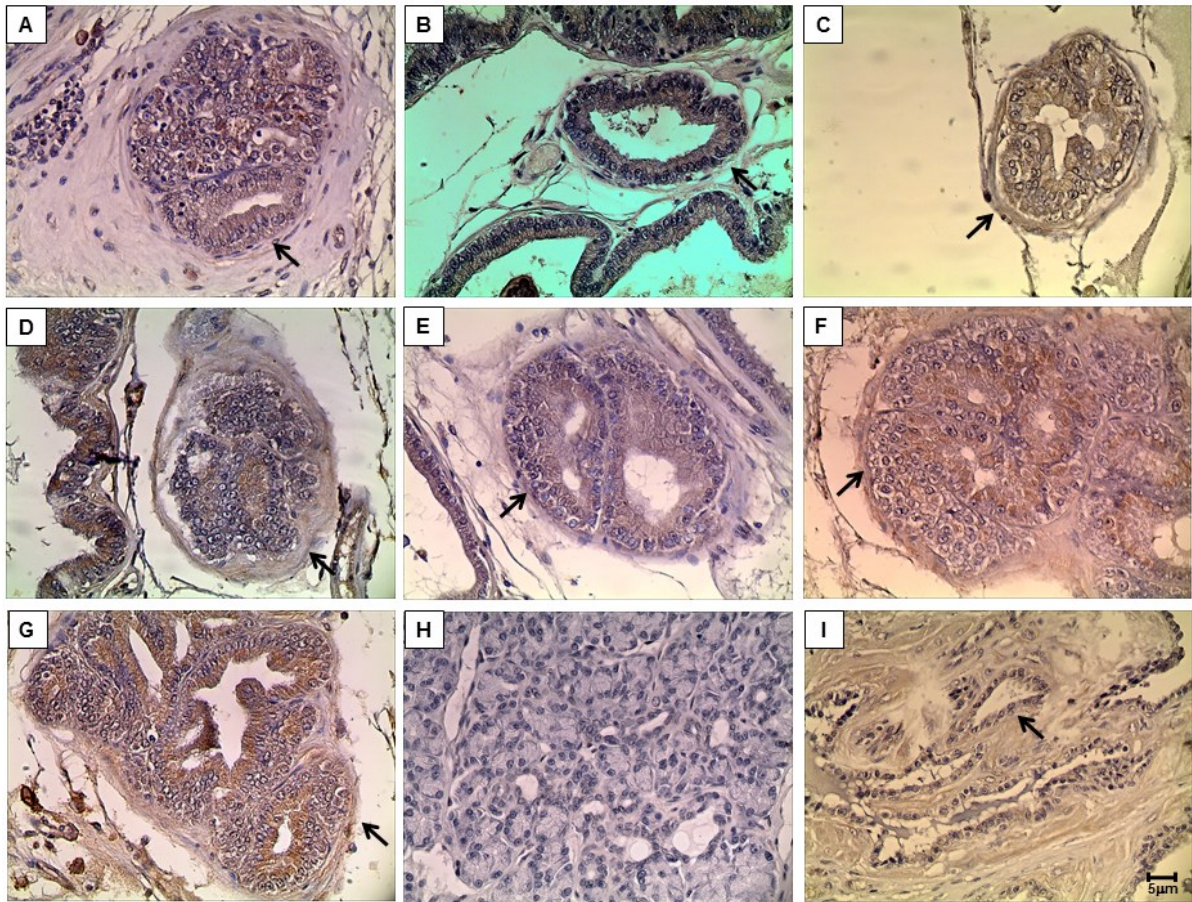


Figura 18. Imunohistoquímica de próstata para Catalase. Grupos: MNU (A,E,H), MNU+PMAPA (B), MNU+TNP470 (C,F,I), MNU+PMAPA+TNP470 (D,G). (A) ABG $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (B) ABG $3^1=3$ C; (C) ABG $3^1=3$ C; (D) ABG $3^1=3$ C; (E) AGI $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (F) AGI $3^1=3$ C; (G) AGI $3^1=3$ C; (H) AAG sem marcação; (I) AAG $3^1=3$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

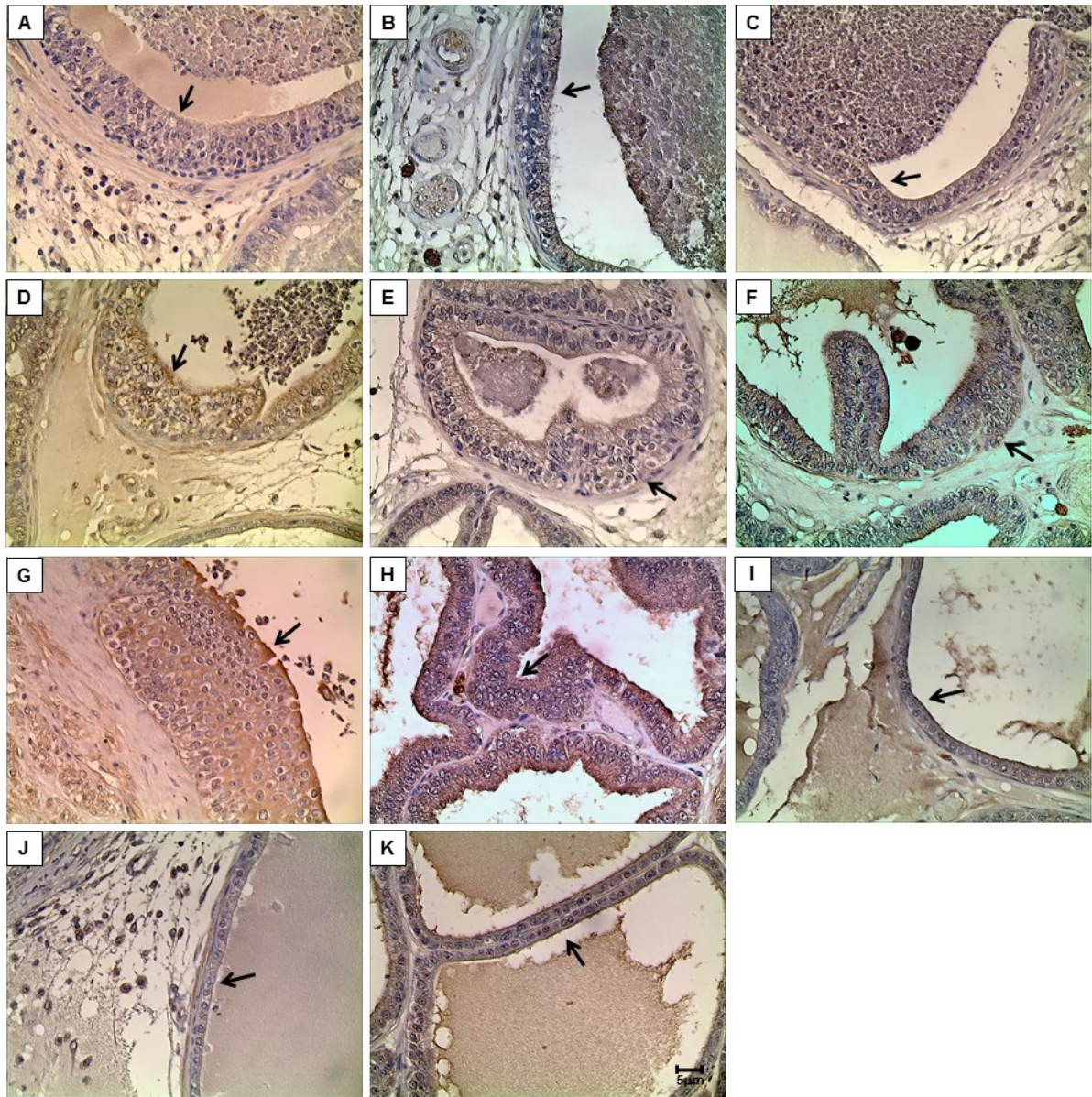


Figura 19. Imunohistoquímica de próstata para GSH-Px1. Grupos: MNU (A,E), MNU+PMAPA (B,F,I), MNU+TNP470 (C,D,G,J), MNU+PMAPA+TNP470 (H,K). (A) PIA $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (B) PIA $3^2=9$ C; (C) PIA $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (D) PIA $1^2=1$ IN, $3^2=9$ C; (E) PIN $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (F) PIN $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (G) PIN $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (H) PIN $2^1=2$ IN, $3^2=9$ C; (I) AP $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (J) AP $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (K) AP $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

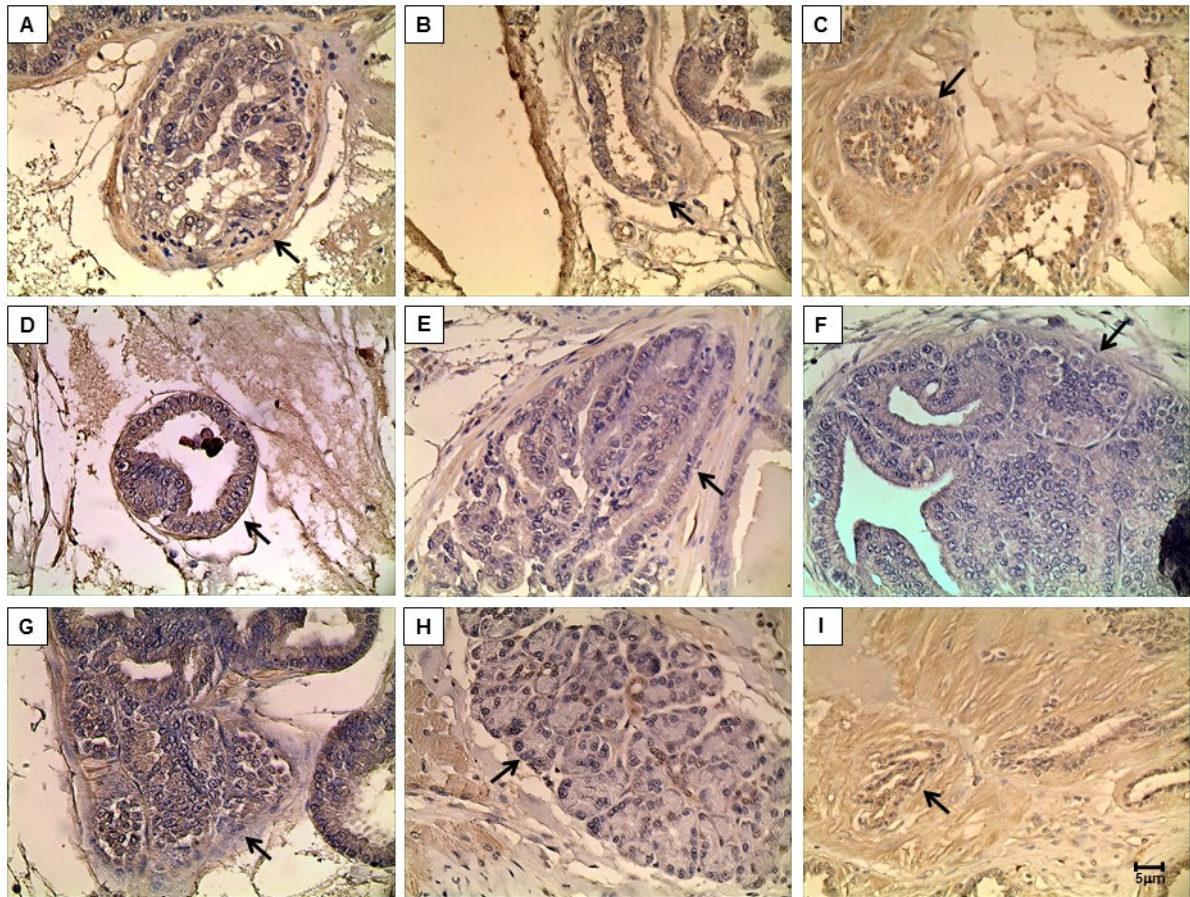


Figura 20. Imunohistoquímica de próstata para GSH-Px1. Grupos: MNU (A,E,H), MNU+PMAPA (B), MNU+TNP470 (C,F,I), MNU+PMAPA+TNP470 (D,G). (A) ABG $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (B) ABG $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (C) ABG $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (D) ABG $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (E) AGI $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (F) AGI $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (G) AGI $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (H) AAG $1^2=1$ IN, $1^1=1$ C; (I) AAG $3^1=3$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

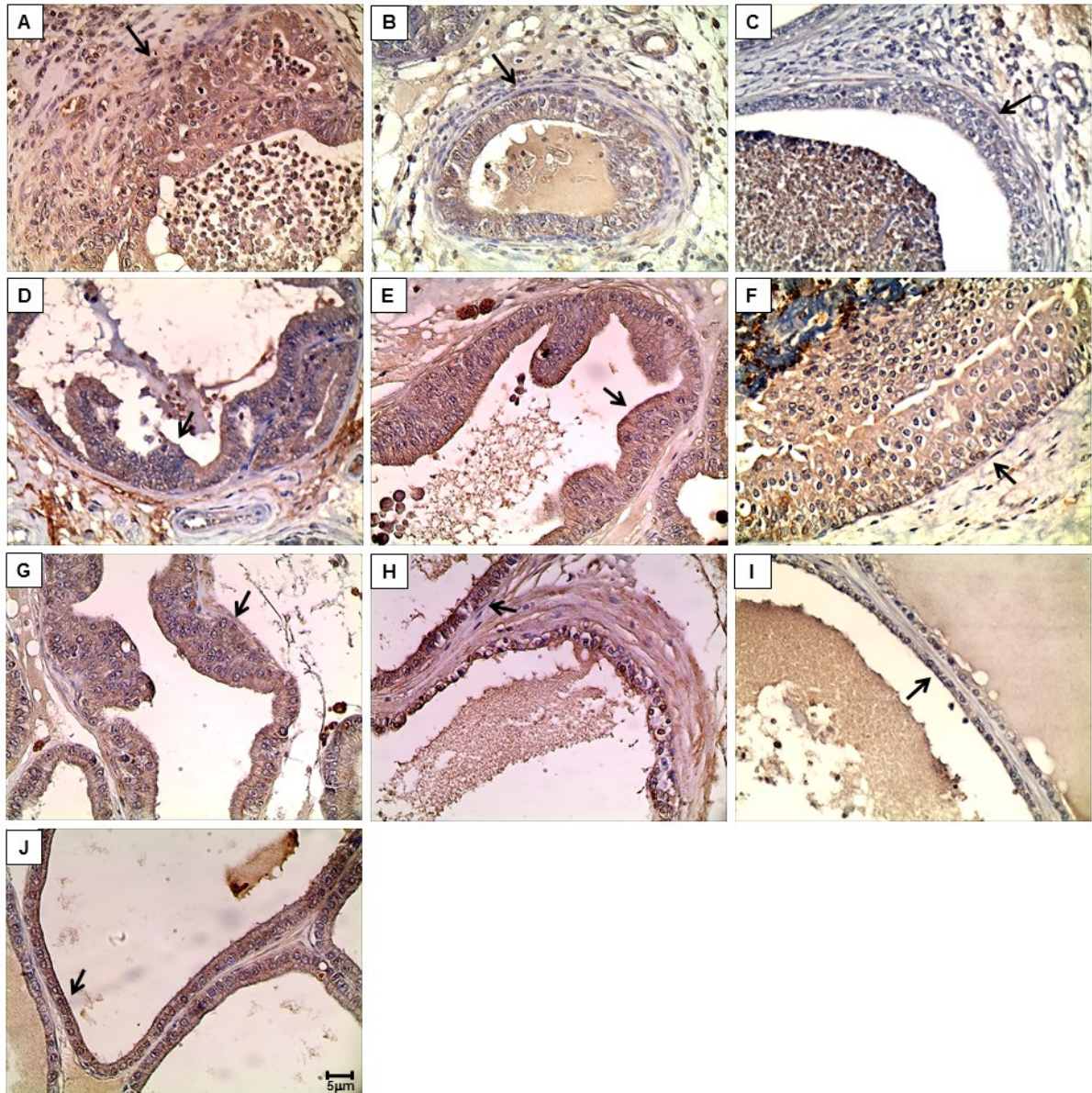


Figura 21. Imunohistoquímica de próstata para NRF2. Grupos: MNU (A,D), MNU+PMAPA (B,E,H), MNU+TNP470 (C,F,I,K), MNU+PMAPA+TNP470 (G,J). (A) PIA $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (B) PIA $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (C) PIA $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (D) PIN $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (E) PIN $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (F) PIN $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (G) PIN $2^1=2$ IN, $3^2=9$ C; (H) AP $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (I) AP $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (J) AP $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

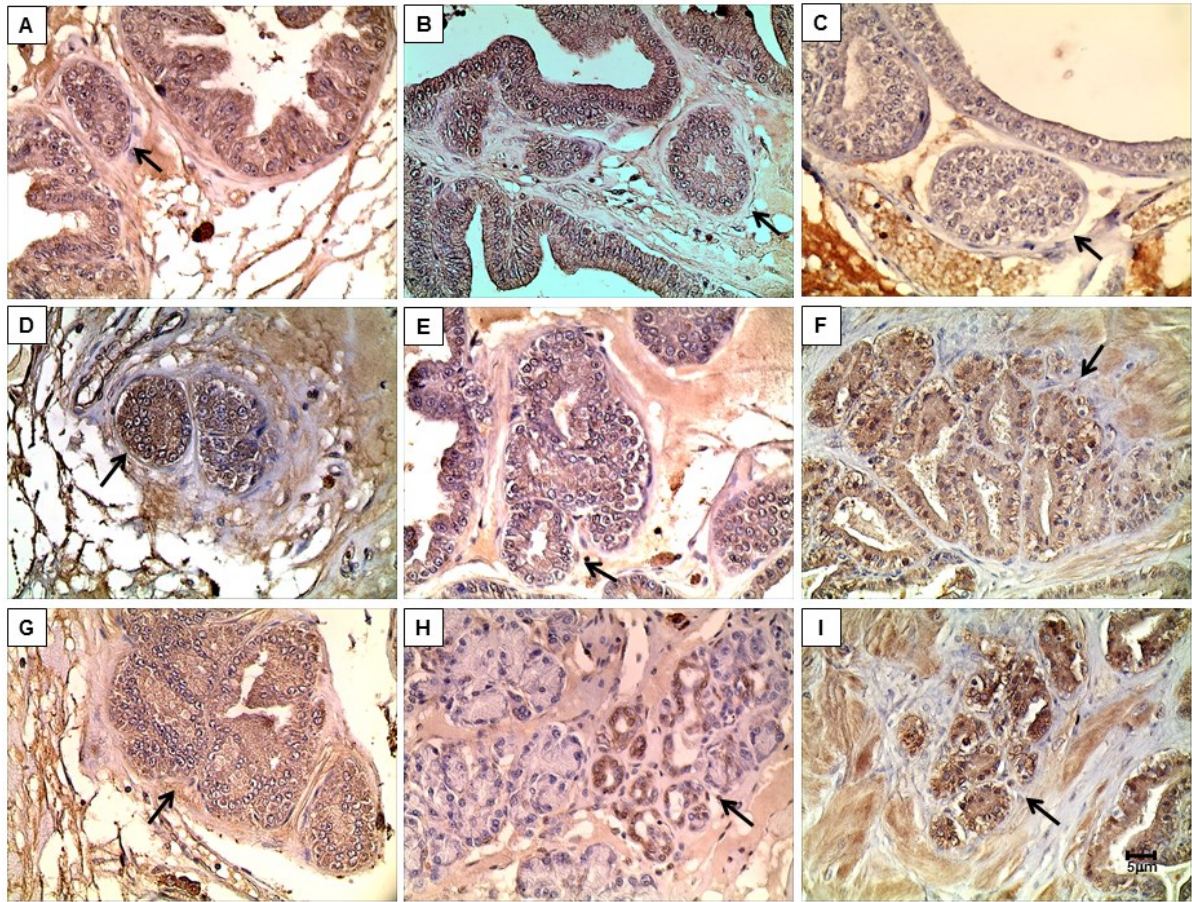


Figura 22. Imunohistoquímica de próstata para NRF2. Grupos: MNU (A,E,H), MNU+PMAPA (B), MNU+TNP470 (C,F, I), MNU+PMAPA+TNP470 (D,G). (A) ABG $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (B) ABG $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (C) ABG $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (D) ABG $1^2=1$ IN, $3^2=9$ C; (E) AGI $2^1=2$ IN, $3^1=3$ C; (F) AGI $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (G) AGI $3^1=3$ C; (H) AAG $1^2=1$ IN, $1^2=1$ C; (I) AAG $2^3=8$ IN, $3^3=27$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

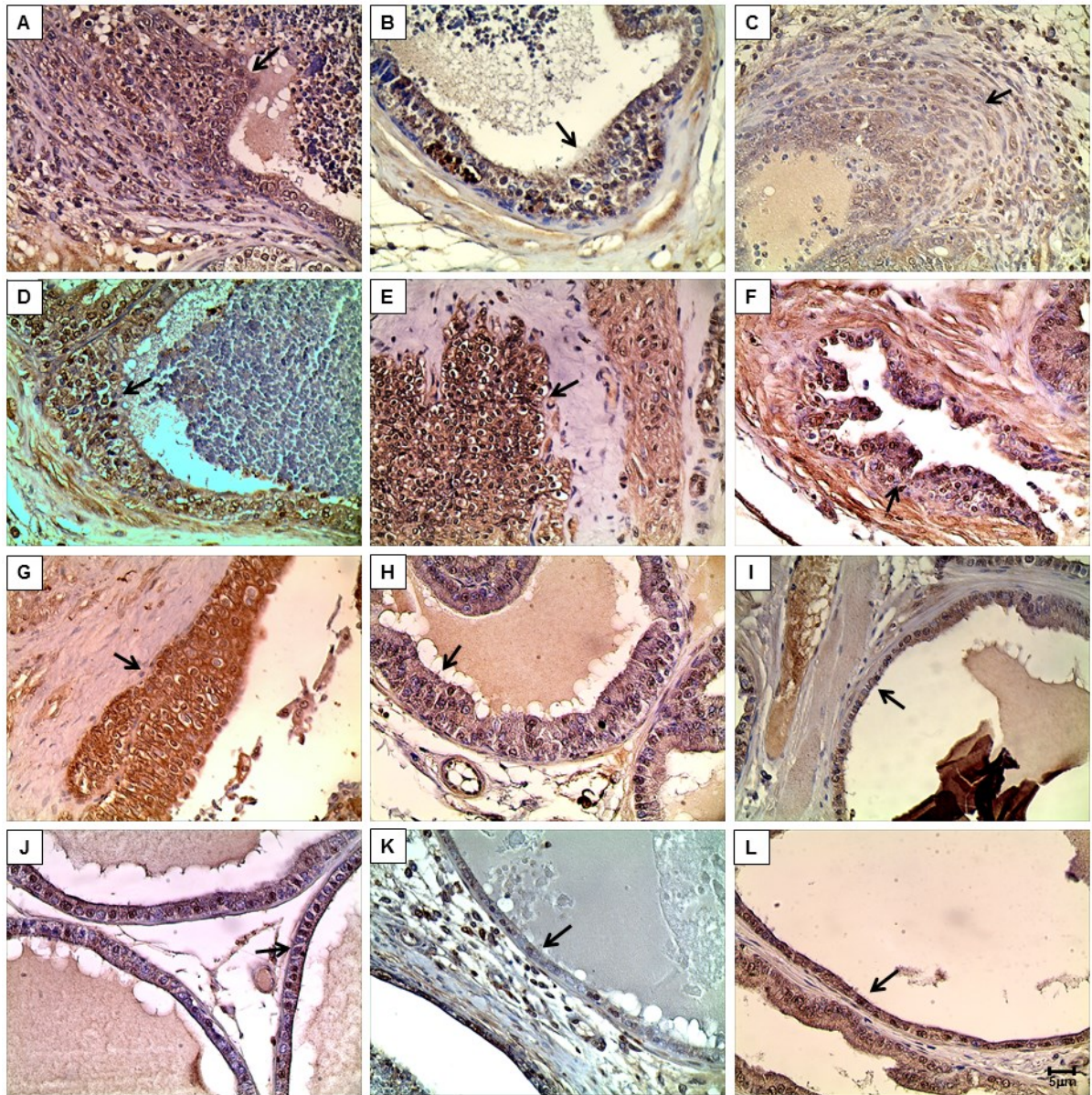


Figura 23. Imunohistoquímica de próstata para NOX4. Grupos: MNU (A,B,E), MNU+PMAPA (C,F,I,J), MNU+TNP470 (D,G,K), MNU+PMAPA+TNP470 (H,L). (A) PIA $3^2=9$ IN, $3^2=9$ C; (B) PIA $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (C) PIA $3^1=3$ IN, $3^1=3$ C; (D) PIA $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (E) PIN $3^3=27$ IN, $3^2=9$ C; (F) PIN $2^3=8$ IN, $3^2=9$ C; (G) PIN $2^3=8$ IN, $3^2=9$ C; (H) PIN $2^3=8$ IN, $3^2=9$ C; (I) AP $2^2=4$ IN, $3^1=3$ C; (J) AP $2^3=8$ IN, $3^2=9$ C; (K) AP $2^3=8$ IN, $3^1=3$ C; (L) AP $2^3=8$ IN, $3^2=9$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

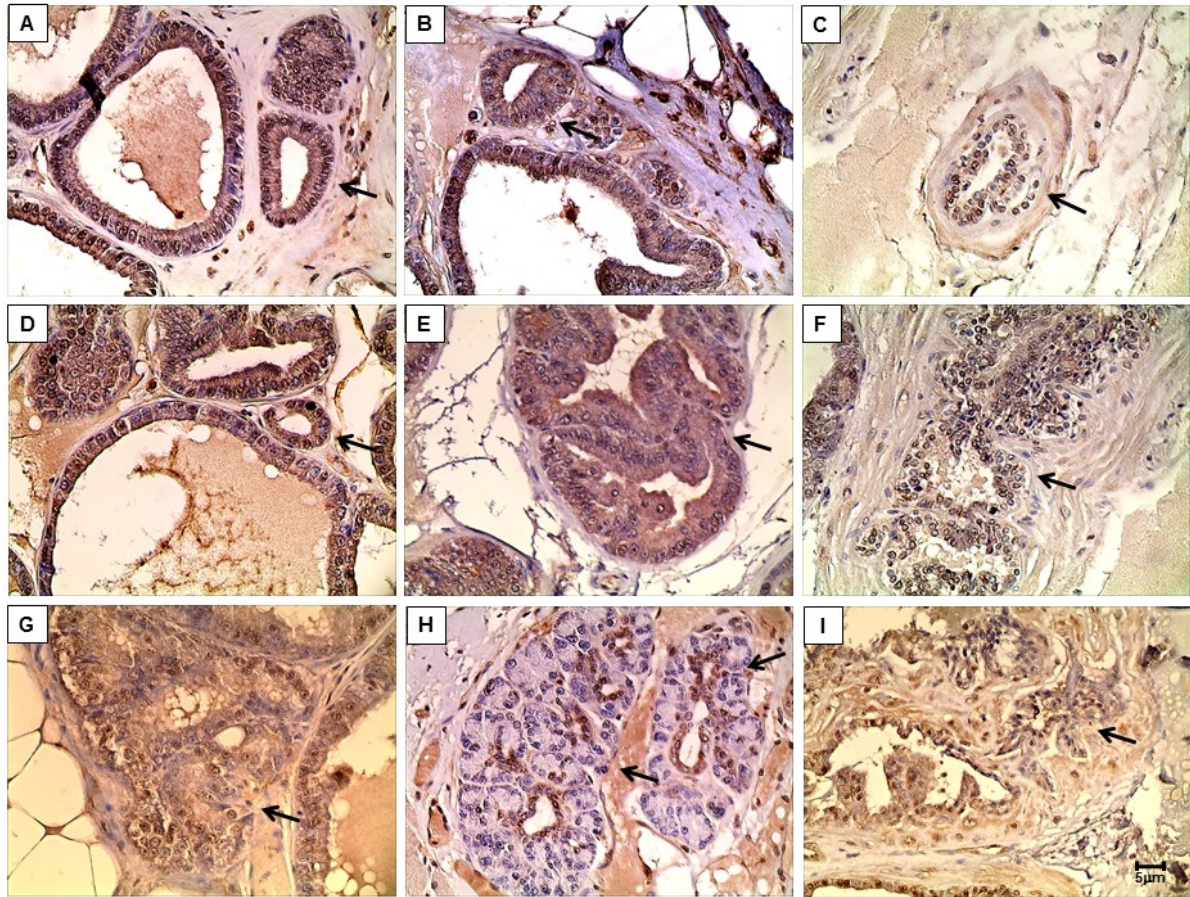


Figura 24. Imunohistoquímica de próstata para NOX4. Grupos: MNU (A,E,H), MNU+PMAPA (B), MNU+TNP470 (C,F), MNU+PMAPA+TNP470 (D,G). (A) ABG $2^3=8$ IN, $3^2=9$ C; (B) ABG $2^3=8$ IN, $3^2=9$ C; (C) ABG $2^2=4$ IN, $3^1=3$ C; (D) ABG $2^2=4$ IN, $3^1=3$ C; (E) AGI $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (F) AGI $2^2=4$ IN, $3^1=3$ C; (G) AGI $2^2=4$ IN, $3^1=3$ C; (H) AAG $1^3=1$ IN, $1^2=1$ C; (I) AAG $2^2=4$ IN, $3^1=3$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

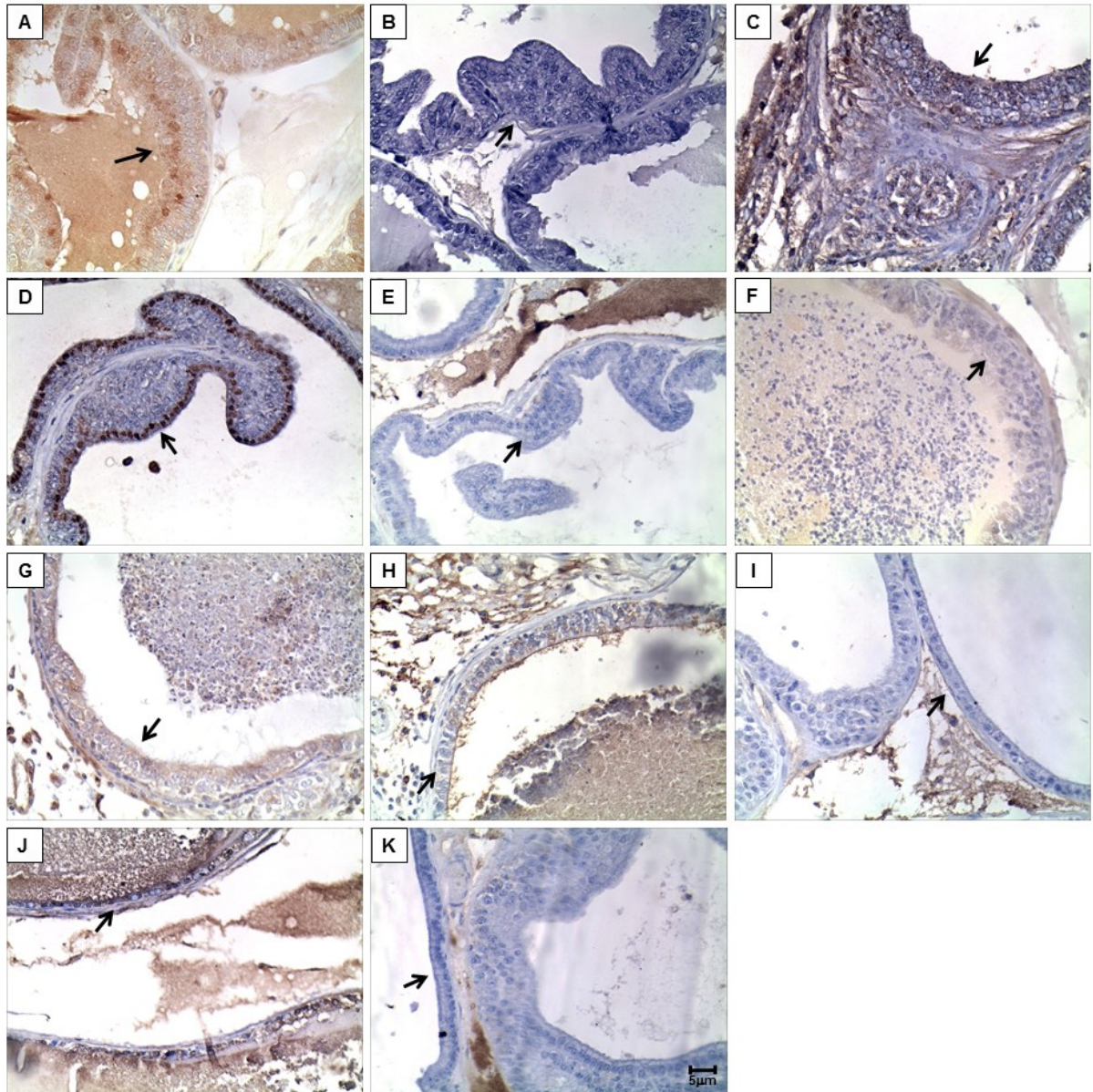


Figura 25. Imunohistoquímica de próstata para HIF1 α . Grupos: MNU (A,F,G), MNU+PMAPA (B,H,I), MNU+TNP470 (C,D,J), MNU+PMAPA+TNP470 (E,K). (A) PIN $3^3=27$ SN, $3^2=9$ C; (B) PIN sem marcação; (C) PIN $3^2=9$ C; (D) PIN $3^3=27$ SN, $3^1=3$ C; (E) PIN sem marcação; (F) PIA $1^2=1$ IN, $3^1=3$ C; (G) PIA $1^2=1$ IN, $3^2=9$ C; (H) PIA $1^1=1$ C; (I) AP sem marcação; (J) AP $2^3=8$ IN, $3^2=9$ C; (K) AP sem marcação. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

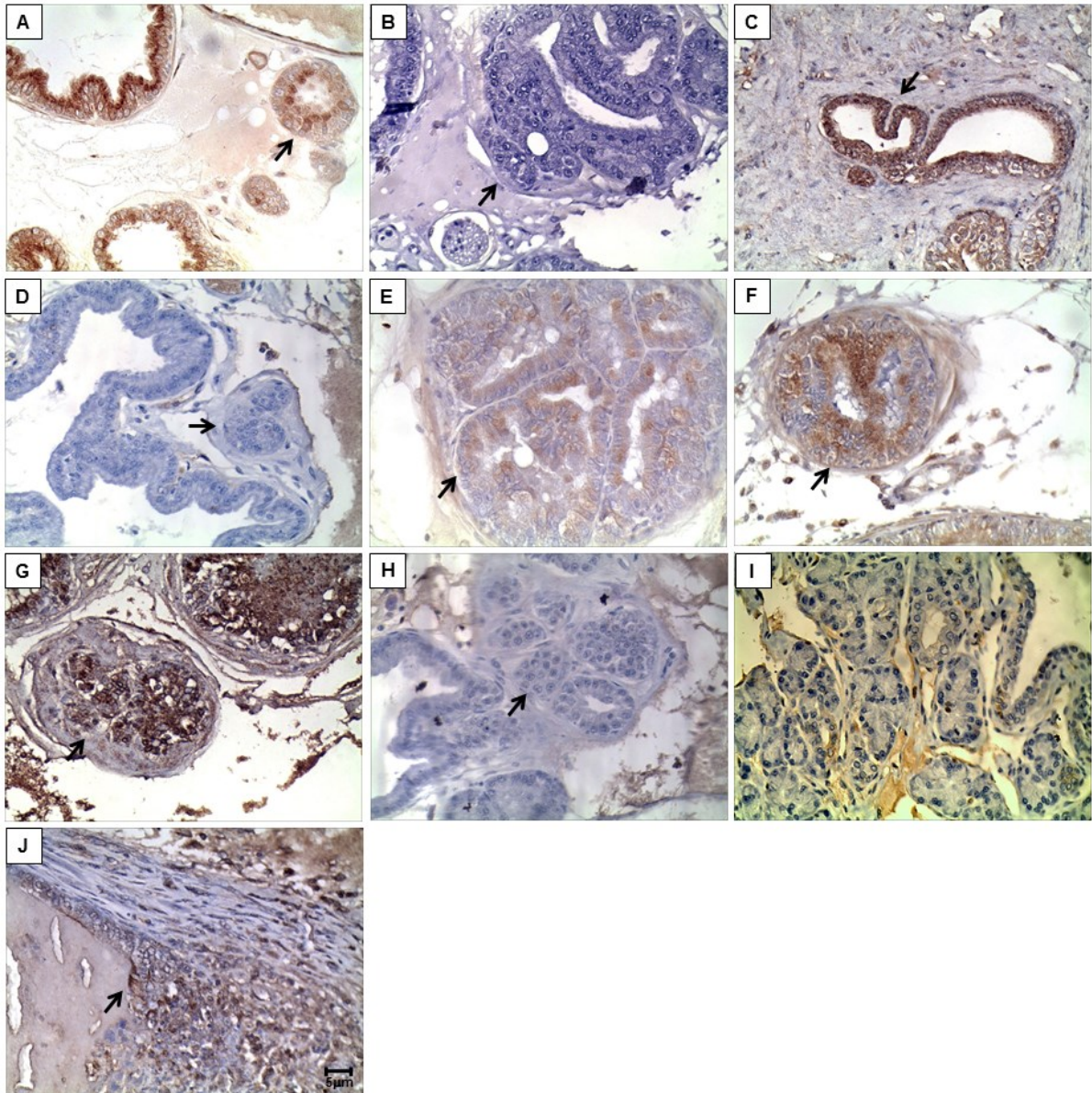


Figura 26. Imunohistoquímica de próstata para HIF1 α . Grupos: MNU (A,E,F,I), MNU+PMAPA (B), MNU+TNP470 (C,G,J), MNU+PMAPA+TNP470 (D,H). (A) ABG 3³=27 SN, 3²=9 C; (B) ABG sem marcação; (C) ABG 1²=1 IN, 3³=27 C; (D) ABG sem marcação; (E) AGI 1²=1 IN, 3²=9 C; (F) AGI 2³=8 IN, 3³=27 C; (G) AGI 2³=8 IN, 3³=27 C; (H) AGI sem marcação; (I) AAG 1²=1 IN, 2¹=2 C. (J) AAG 1²=1 IN, 3²=9 C, Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

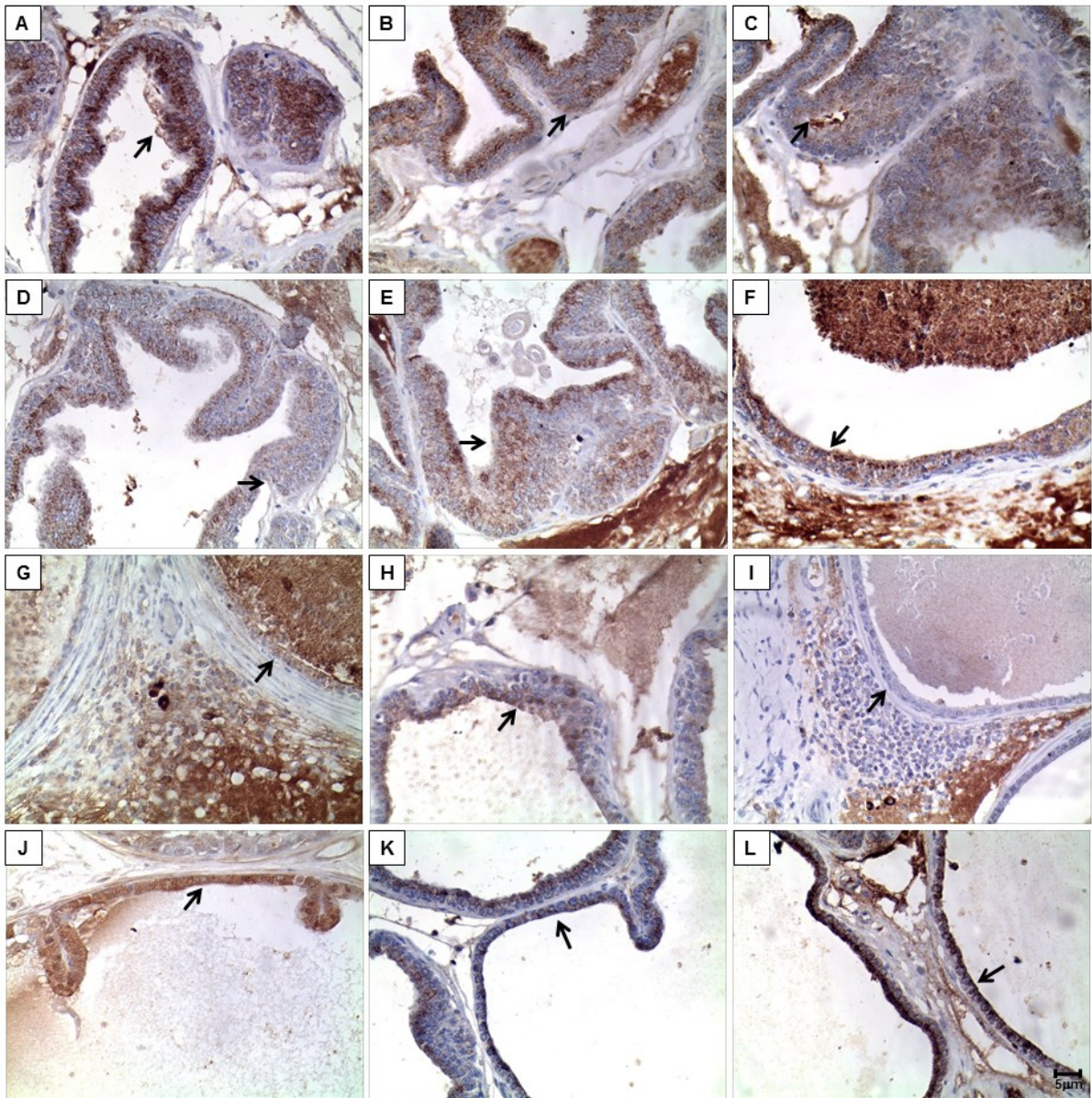


Figura 27. Imunohistoquímica de próstata para VEGF. Grupos: MNU (A,F), MNU+PMAPA (B,C,G,H,J), MNU+TNP470 (D,E,I,K), MNU+PMAPA+TNP470 (E,L). (A) PIN $3^3=27$ SN, $3^2=9$ C; (B) PIN $3^2=9$ SN, $3^1=3$ C; (C) PIN $3^2=9$ C; (D) PIN $3^1=3$ C; (E) PIN $3^2=9$ C; (F) PIA $3^2=9$ C; (G) PIA $3^1=3$ C; (H) PIA $3^3=27$ SN, $3^2=9$ C; (I) PIA $3^1=3$ C; (J) AP $2^3=8$ IN, $3^3=27$ C; (K) AP $3^3=27$ SN, $3^1=3$ C; (L) AP $3^3=27$ SN, $3^2=9$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

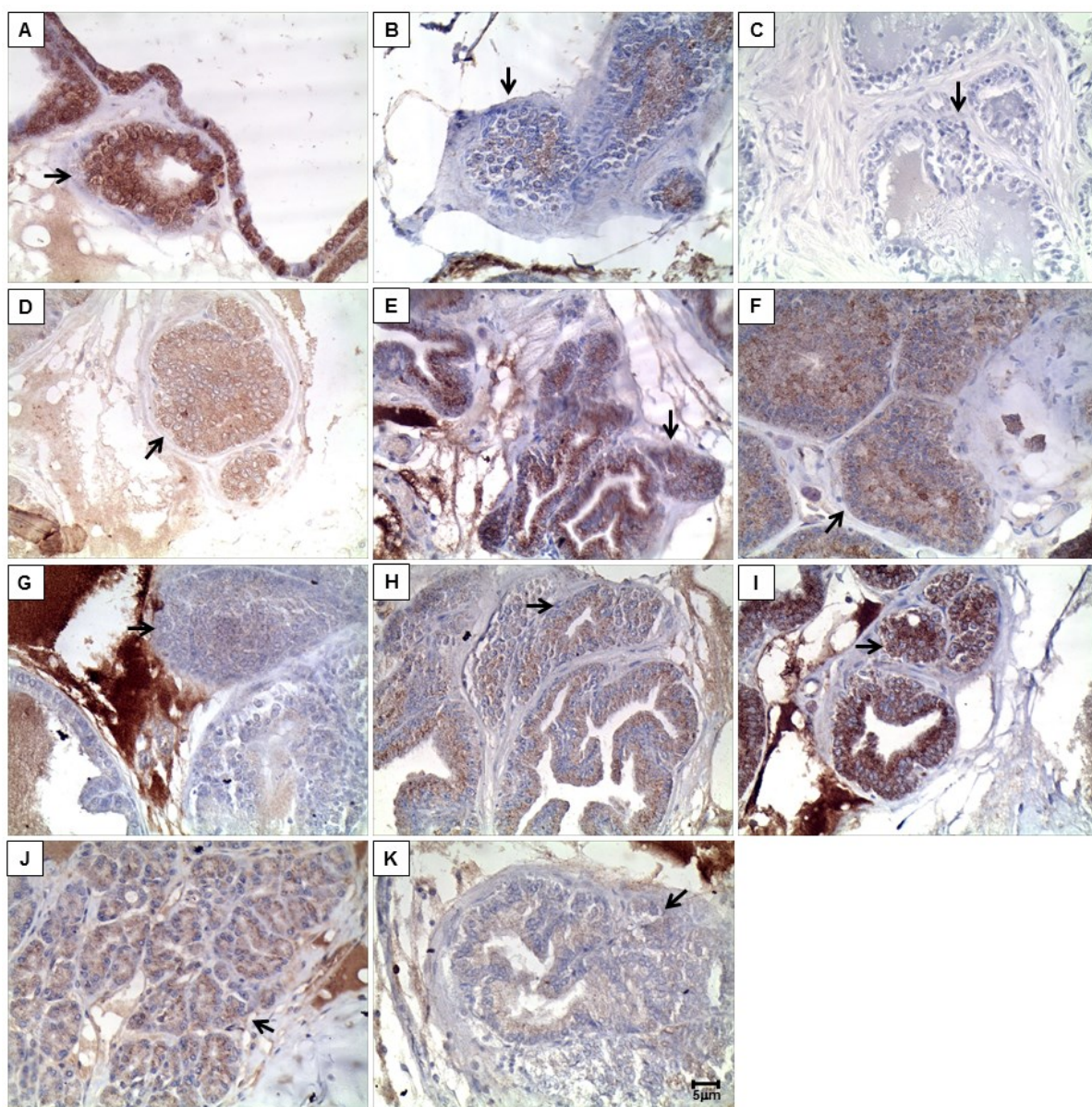


Figura 28. Imunohistoquímica de próstata para VEGF. Grupos: MNU (A,F,J), MNU+PMAPA (B), MNU+TNP470 (C,G,H,K), MNU+PMAPA+TNP470 (D,E,I). (A) ABG $2^3=8$ IN, $3^3=27$ C; (B) ABG $3^2=9$ C, $3^1=3$ C; (C) ABG sem marcação; (D) ABG $3^2=9$ C; (E) ABG $3^3=27$ C; (F) AGI $3^2=9$ C; (G) AGI $3^1=3$ C; (H) AGI $3^2=9$ C; (I) AGI $1^3=1$ IN, $3^3=27$ C; (J) AAG $3^2=9$ C; (K) AAG $3^1=3$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

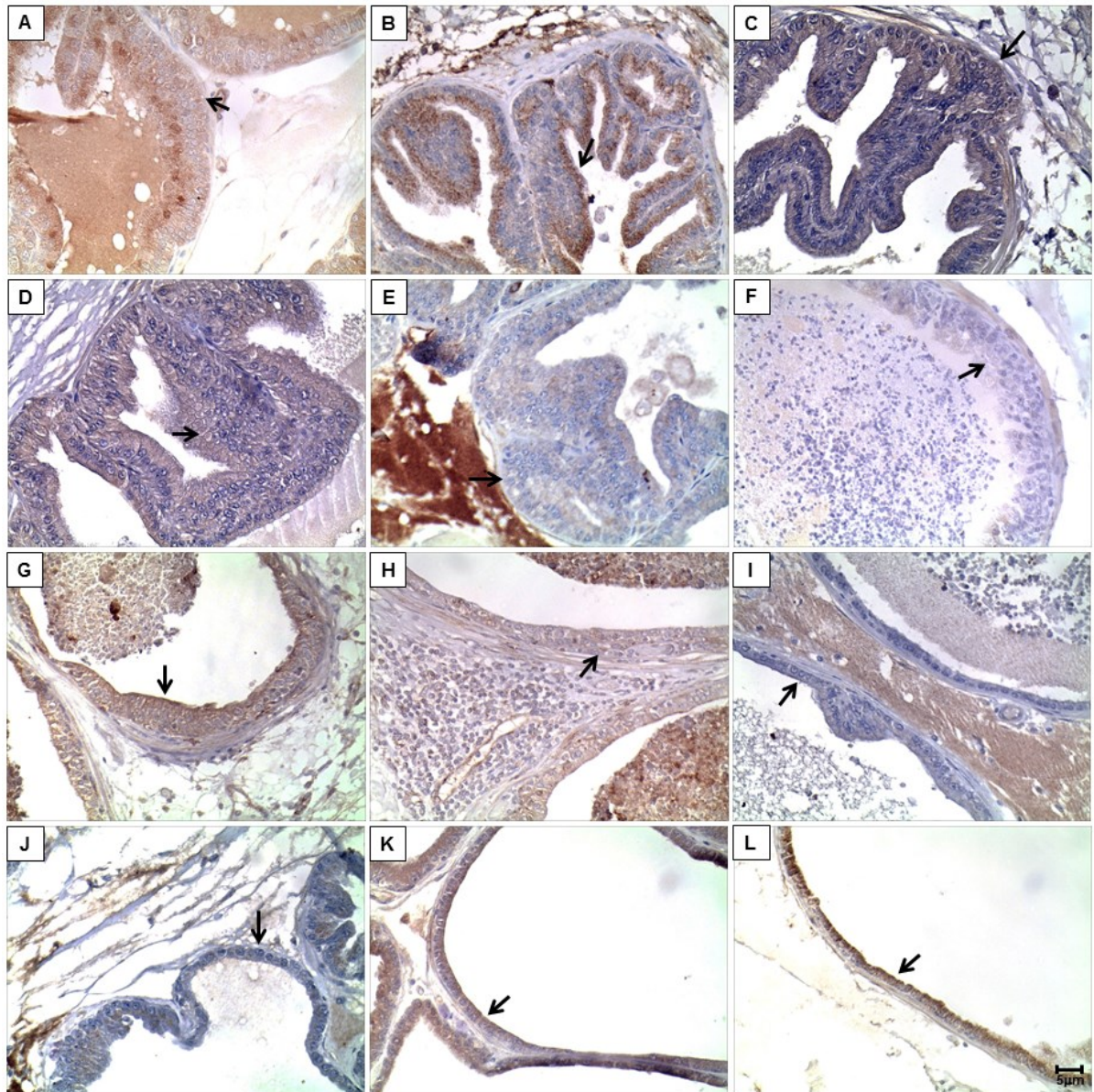


Figura 29. Imunohistoquímica de próstata para Endostatina. Grupos: MNU (A,B,F), MNU+PMAPA (C,G,I,K), MNU+TNP470 (D,H,I,J), MNU+PMAPA+TNP470 (E,L). (A) PIN $3^2=9$ SN, $3^1=3$ C; (B) PIN $3^3=27$ SN, $3^1=3$ C; (C) PIN $3^2=9$ C; (D) PIN $3^2=9$ C; (E) PIN $3^1=3$ C; (F) PIA $3^1=3$ C; (G) PIA $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (H) PIA $3^1=3$ C; (I) AP $3^1=3$ C; (J) AP $3^1=3$ C; (K) AP $3^2=9$ C; (L) AP $3^3=27$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

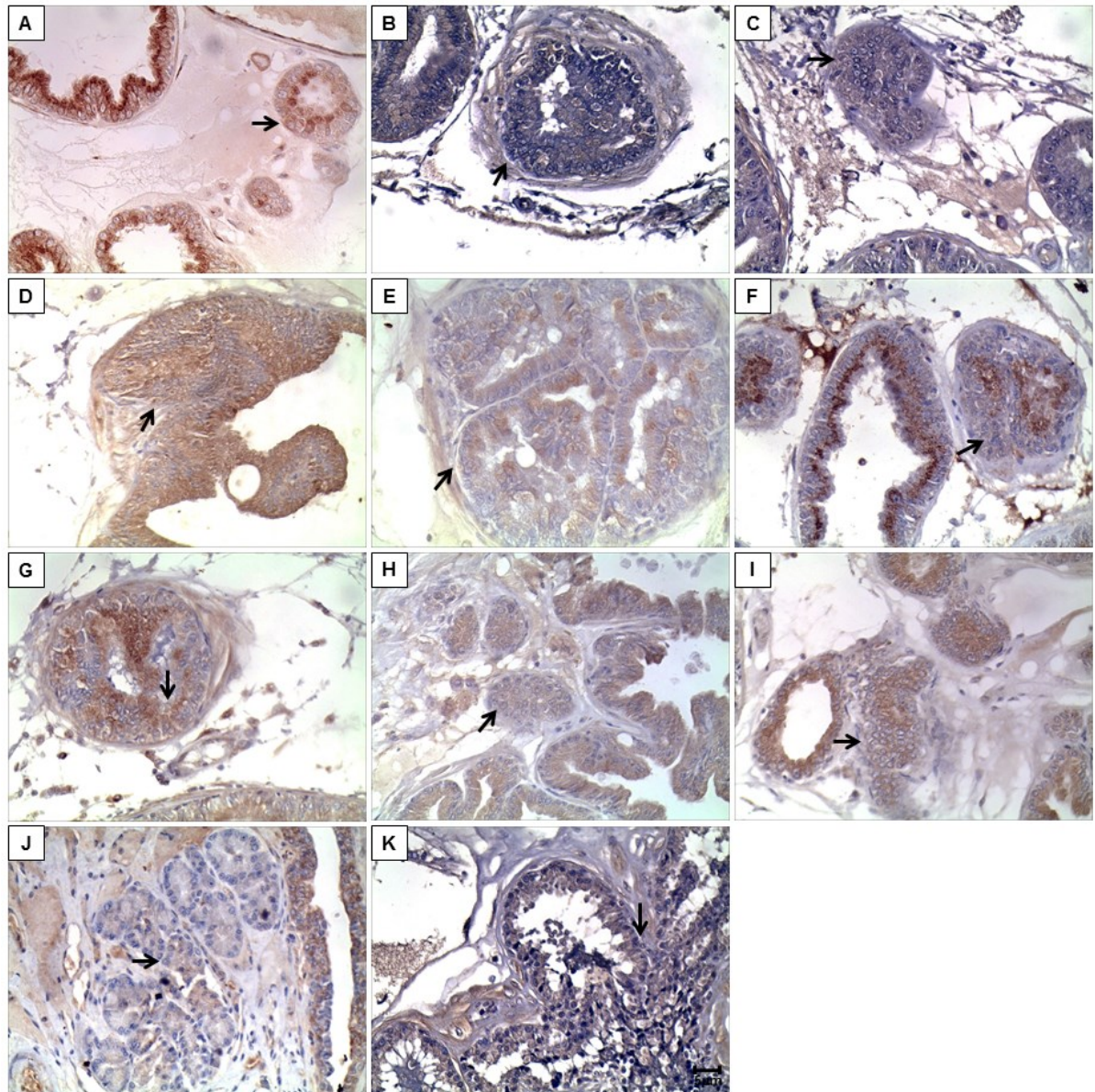


Figura 30. Imunohistoquímica de próstata para Endostatina. Grupos: MNU (A,E,F,G,J), MNU+PMAPA (B), MNU+TNP470 (C,H,K), MNU+PMAPA+TNP470 (D,I). (A) ABG $1^1=1$ IN, $3^1=3$ C; (B) ABG $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (C) ABG $2^2=4$ IN, $3^2=9$ C; (D) ABG $3^3=27$ C; (E) AGI $2^2=4$ SN, $3^1=3$ C; (F) AGI $3^3=27$ SN, $3^1=3$ C; (G) $3^3=27$ SN, $3^2=9$ C; (H) AGI $3^1=3$ C; (I) AGI $3^2=9$ C; (J) AAG $3^1=3$ C; (K) AAG $3^2=9$ C. Setas em lesões prostáticas. Hematoxilina, aumento de 400x.

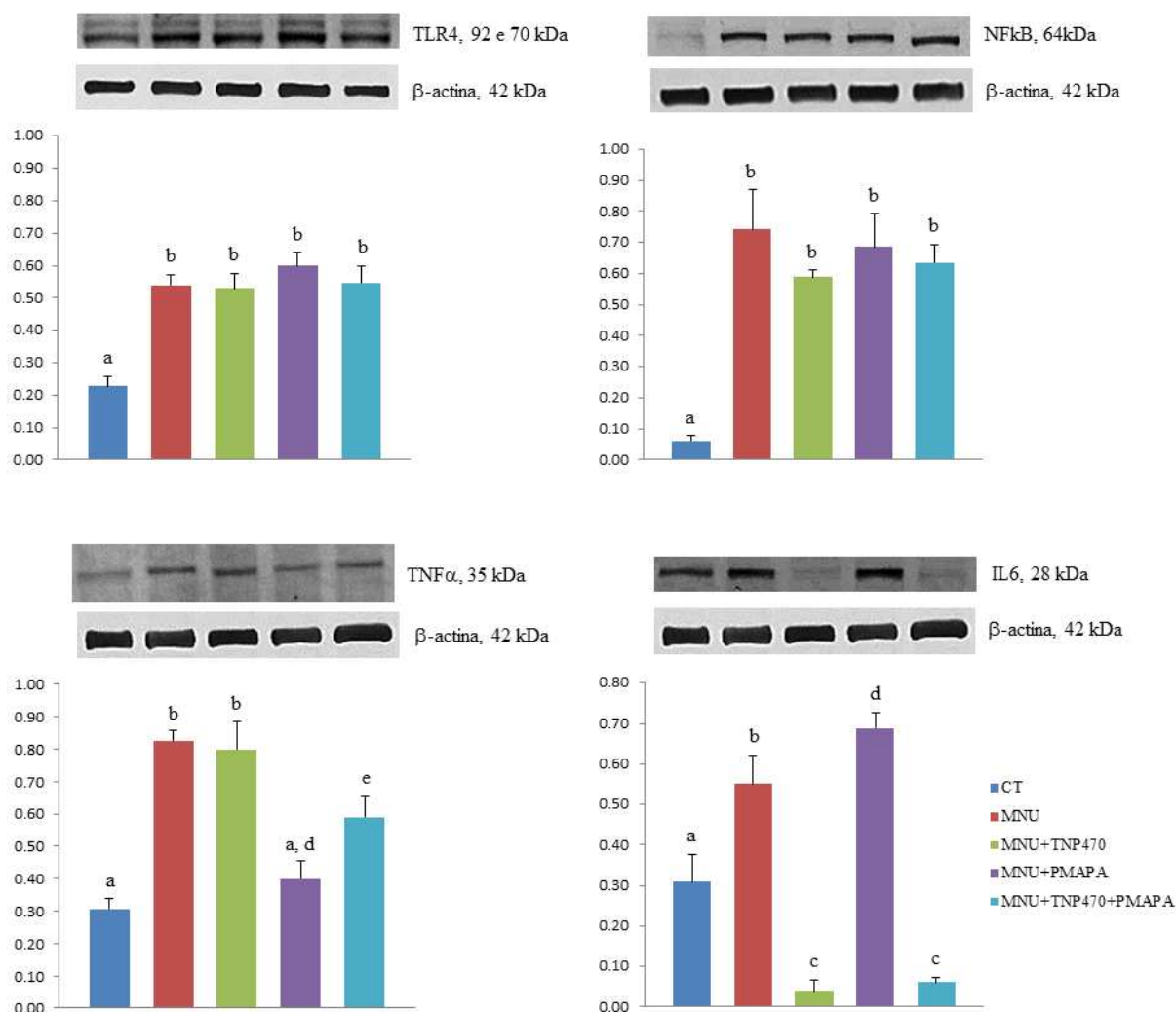


Figura 31. Representação do Western Blotting e determinação semiquantitativa para as proteínas TLR4, NFkB, TNFα e IL6 extraídas do lobo ventral prostático dos grupos: controle (CT), MNU, MNU+TNP470, MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA. A β-actina foi usada como controle endógeno. Legenda: (a) estatisticamente igual ao controle; (b) estatisticamente igual ao MNU; (c) estatisticamente igual ao MNU+TNP470; (d) estatisticamente igual ao MNU+PMAPA; (e) estatisticamente igual ao MNU+TNP470+PMAPA.

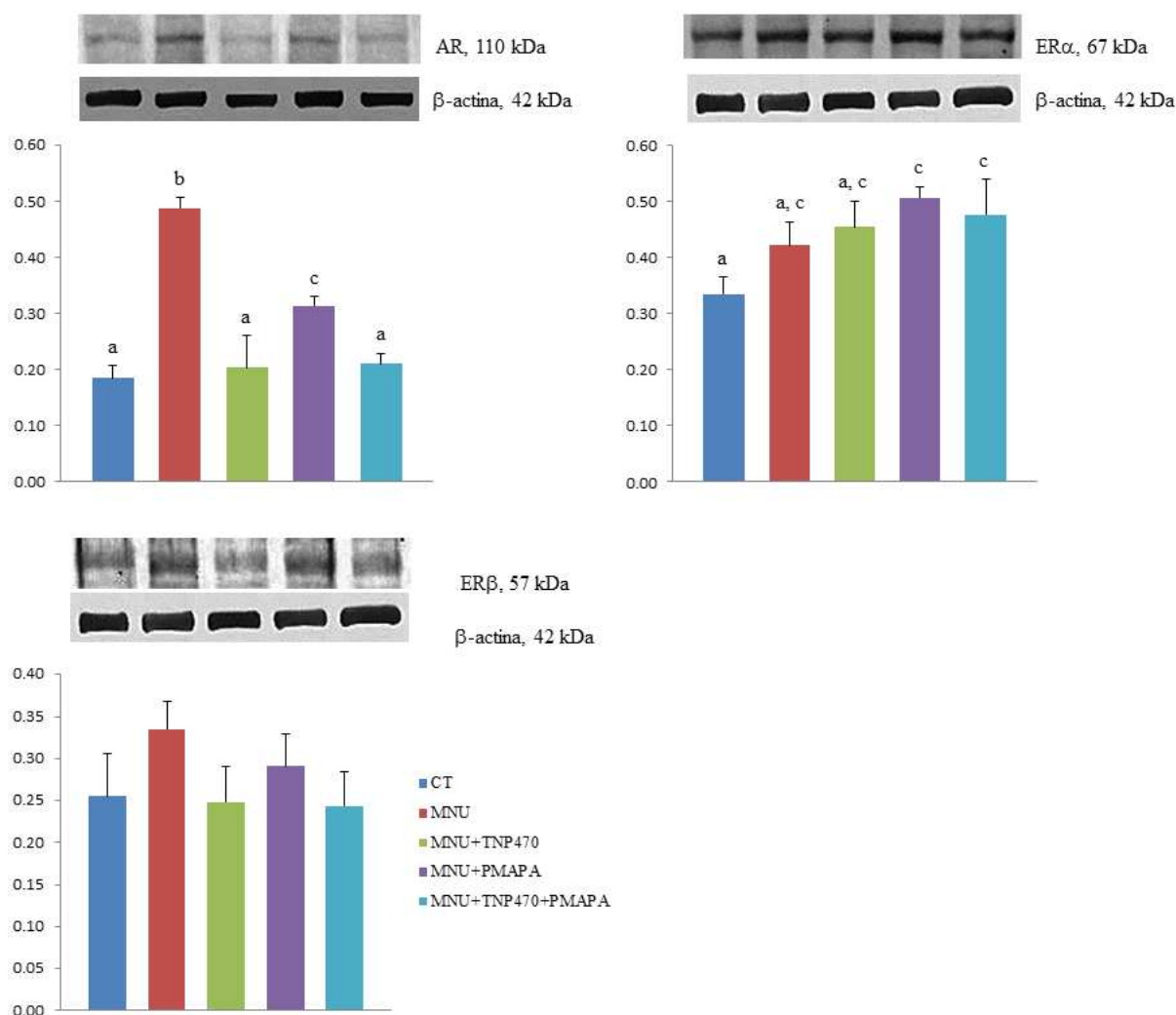


Figura 32. Representação do Western Blotting e determinação semiquantitativa para as proteínas AR, ERα e ERβ extraídas do lobo ventral prostático dos grupos: controle (CT), MNU, MNU+TNP470, MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA. A β-actina foi usada como controle endógeno. Legenda: (a) estatisticamente igual ao controle; (b) estatisticamente igual ao MNU; (c) estatisticamente igual ao MNU+PMAPA.

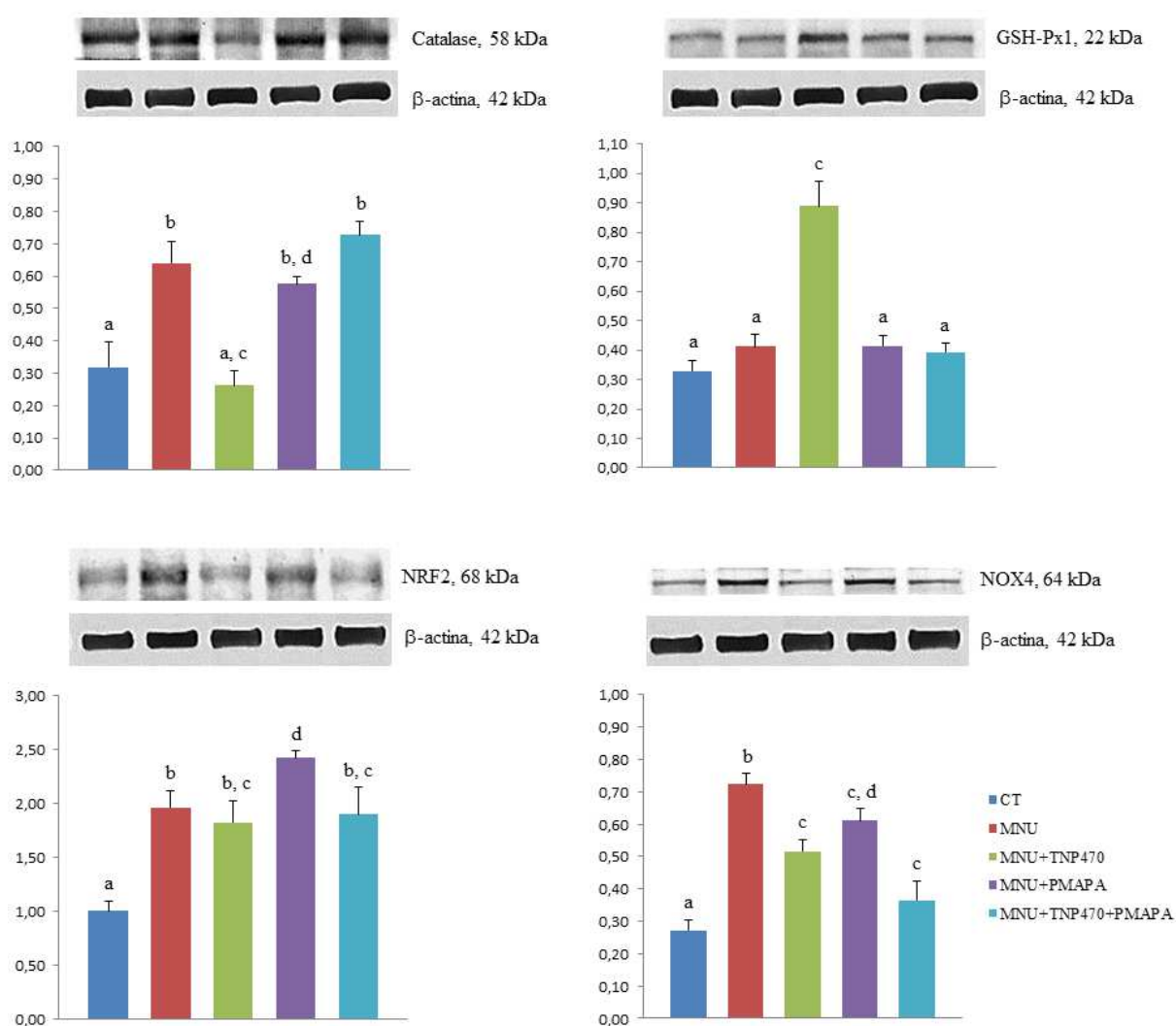


Figura 33. Representação do Western Blotting e determinação semiquantitativa para as proteínas Catalase, GSH-Px1, NRF2 e NOX4 extraídas do lobo ventral prostático dos grupos: controle (CT), MNU, MNU+TNP470, MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA. A β-actina foi usada como controle endógeno. Legenda: (a) estatisticamente igual ao controle; (b) estatisticamente igual ao MNU; (c) estatisticamente igual ao MNU+TNP470; (d) estatisticamente igual ao MNU+PMAPA.

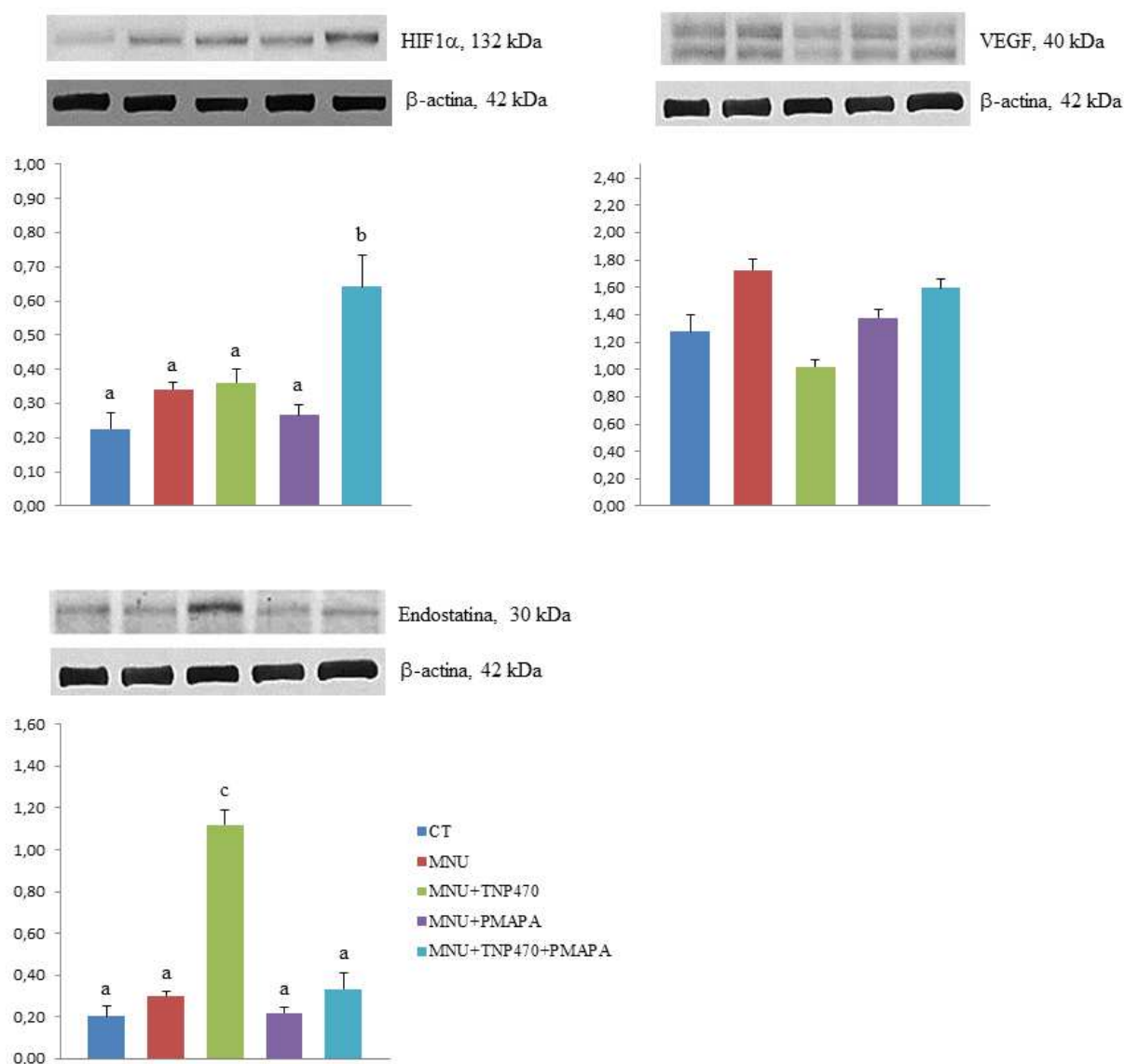
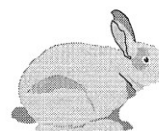


Figura 34. Representação do Western Blotting e determinação semiquantitativa para as proteínas HIF1 α , VEGF e Endostatina extraídas do lobo ventral prostático dos grupos: controle (CT), MNU, MNU+TNP470, MNU+PMAPA e MNU+TNP470+PMAPA. A β -actina foi usada como controle endógeno. Legenda: (a) estatisticamente igual ao controle; (b) estatisticamente igual ao MNU+TNP470+PMAPA; (c) estatisticamente igual ao MNU+TNP470.



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Efeitos da Imunoterapia com P-MAPA Associada à Terapia Antiangiogênica no Tratamento de Lesões Prostáticas Induzidas Quimicamente em Ratos" (protocolo nº 3053-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Wagner José Fávaro / Letícia Montanholi Apolinário, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 13 de maio de 2013.

Campinas, 13 de maio de 2013.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Efeitos da Imunoterapia com PMAPA Associada à Terapia Antiangiogênica no Tratamento de Lesões Prostáticas Quimicamente induzidas em Ratos**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 03 de Novembro de 2016.

Assinatura : Leticia M. Apolinário
Nome do(a) autor(a): **Leticia Montanholi Apolinário**
RG n.º 41817260-2

Assinatura : Wagner José Fávaro
Nome do(a) orientado(a): **Wagner José Fávaro**
RG n.º 33.478.777-4