



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ELLEN NOGUEIRA PANGRAZI

RESPOSTA DA MATRIZ EXTRACELULAR, ANGIOGÊNICA E PROLIFERATIVA NO
ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA EM CAMUNDONGOS TRAMP FRENTE AO
TRATAMENTO COM NINTEDANIBE

CAMPINAS

2016

ELLEN NOGUEIRA PANGRAZI

**RESPOSTA DA MATRIZ EXTRACELULAR, ANGIOGÊNICA E
PROLIFERATIVA NO ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA EM
CAMUNDONGOS TRAMP FRENTE AO TRATAMENTO COM
NINTEDANIBE**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção do
título de Mestra em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Tecidual.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA ELLEN NOGUEIRA PANGRAZI
E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA VALÉRIA HELENA ALVES CAGNON QUITETE

Orientador: VALÉRIA HELENA ALVES CAGNON QUITETE

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 138439/2014-1

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

N689r Nogueira-Pangrazi, Ellen, 1992-
Resposta da matriz extracelular, angiogênica e proliferativa no adenocarcinoma de próstata em camundongos TRAMP frente ao tratamento com nintedanibe / Ellen Nogueira Pangrazi. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Próstata - Câncer. 2. Inibidores da angiogênese. 3. Matriz extracelular. 4. Camundongos TRAMP. I. Cagnon, Valéria Helena Alves, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Extracellular matrix, angiogenic and proliferative response in prostate adenocarcinoma of TRAMP mice in the nintedanib treatment

Palavras-chave em inglês:

Prostate - Cancer

Angiogenesis inhibitors

Extracellular matrix

TRAMP mice

Área de concentração: Biologia Tecidual

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Valéria Helena Alves Cagnon Quitete [Orientador]

Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro

Odair Aguiar Junior

Data de defesa: 25-08-2016

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 25/08/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Prof. Dr. Odair Aguiar Júnior

Profa. Dra. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por ter me capacitado para dar cada passo em direção a concretização desse trabalho.

A minha mãe **Paula**, pela sua dedicação, conselhos e suporte durante a minha vida.

Ao meu pai, **Marcelo**, por me encorajar ao demonstrar sua satisfação pelas minhas conquistas.

Aos meus irmãos **Alan** e **Henrique** e aos meus **avós**, por acreditarem e apoiarem a realização de meus objetivos.

Ao meu marido **Felipe**, que fez dos meus objetivos as suas próprias metas e se empenhou em todo momento para caminhar comigo em direção aos meus sonhos.

A Professora Doutora **Valéria Helena Alves Cagnon Quitete**, por me receber como parte deste grupo de pesquisa onde vivenciei o amadurecimento não só da minha vida acadêmica, mas pessoal e por sempre despendar tempo de qualidade em cada momento do desempenho desse trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, sem os quais eu não teria desempenhado meu trabalho da melhor maneira que consegui. A **Larissa Kido**, pelos momentos investidos em dedicação ao meu trabalho através do seu ensino e conselhos, por sempre se mostrar pronta para me auxiliar não só no âmbito acadêmico, mas na vida. A **Celina Lamas**, por alegrar nossos dias com seu humor e carinho, e por sua prontidão em ajudar. Ao **Fabio Montico**, pela sua ótima companhia e por me ajudar a realizar a padronização dos meus protocolos. Ao **Rafael Sauce**, pelas risadas que proporcionou e pelo auxílio nas rotinas de laboratório.

Aos **técnicos** do Departamento de Biologia Celular e Estrutural, que forneceram ferramentas importantes para a concretização desse trabalho.

A **Líliam Alves Senne Panagio**, por desempenhar suas funções com prontidão e excelência em todos os momentos que necessitei do seu auxílio.

Aos **professores** das disciplinas que cursei, os quais me proporcionaram amadurecimento científico e pedagógico.

As professoras doutoras, **Dora Maria Grassi Kassisse** e **Sarah Arana** por sempre estarem à disposição para me atender e compartilhar seus saberes.

Ao **CNPq**, pelo suporte financeiro e incentivo à pesquisa.

Ao Programa de **Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural** pelo incentivo ao desenvolvimento da ciência, bem como do ensino desta.

*“O saber a gente aprende com os mestres e com os livros.
A sabedoria se aprende com a vida e com os humildes”.*

Cora Coralina

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância
AR: receptor androgênico
BIBF1120: Nintedanibe
CEMIB: centro multidisciplinar para investigação biológica na área da ciência em animais de laboratório
CEUA: comissão de ética no uso de animais
CaP: câncer de próstata
DAB: 3'3 diaminobenzidina
DG: distroglicana
 α -DG: subunidade alfa da distroglicana
 β -DG: subunidade beta da distroglicana
DU145: linhagem celular de câncer de próstata derivada de metástase cerebral
FGF: fatores de crescimento fibroblásticos
FGF-2: fator de crescimento fibroblástico 2
FGFR: receptores de fatores de crescimento fibroblásticos
IGF: fator de crescimento homólogo à insulina
IGFR1: receptor de fator de crescimento homólogo à insulina 1
LA: lobo anterior ou glândula de coagulação da próstata
LD: lobo dorsal da próstata
LL: lobo lateral da próstata
LV: lobo ventral da próstata
LDL: lobo dorsolateral da próstata
MEC: matriz extracelular
MMP: metaloproteinase
NIP: neoplasia intraepitelial prostática
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
SDS: Dodecil sulfato de sódio
TBS-T: *Tris-buffered saline with tween*
TRAMP: camundongos transgênicos para adenocarcinoma de próstata
VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular.

RESUMO

O mecanismo de progressão do câncer de próstata depende da proliferação epitelial, habilidade invasiva, além de fatores de crescimento. O nintedanibe (BIBF 1120) tem sido relatado como inibidor das vias de FGF e VEGF, exibindo atividades antitumorais. Em adição, o camundongo transgênico para adenocarcinoma de próstata (TRAMP) é um modelo frequentemente utilizado no estudo do câncer de próstata. Assim, o presente estudo objetivou caracterizar a morfologia, além de moléculas envolvidas na estrutura da membrana basal, matriz extracelular, bem como nos processos de angiogênese e mitogênico no lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP em diferentes estágios iniciais do desenvolvimento tumoral, com e sem tratamento com a droga nintedanibe. Para tanto, 45 camundongos machos transgênicos da linhagem TRAMP foram divididos em: grupos controles, eutanasiados com 8 (TC8), 12 (TC12) e 16 (TC16) semanas de idade e grupos tratados com nintedanibe na dose de 10 mg/Kg/dia durante 4 semanas e eutanasiados com 12 (TN12) e 16 (TN16) semanas de idade. O lobo dorsolateral dos camundongos dos grupos experimentais foi coletado para a avaliação de microscopia de luz, imunohistoquímica, *Western Blotting* e análise da densidade de microvasos. Os grupos controles TC12 e TC16 apresentaram predominância de neoplasia intraepitelial prostática (NIP) de baixo e alto grau, respectivamente. Ainda, hipertrofia e hiperplasia estromal foram observados nesses grupos. O tratamento com nintedanibe aumentou a frequência de ácinos sem lesão, além de diminuir NIP de baixo grau e densidade de máxima vascularização no grupo TN12. Em adição, nintedanibe diminuiu a ocorrência de adenocarcinoma bem diferenciado e aumentou α e β distroglicanas, no grupo TN16, sendo que estes últimos estavam diminuídos no grupo TC16. Também, a laminina 1 diminuiu nos animais controles TRAMP e aumentou com o tratamento no grupo TN16. Em contraste, a laminina 5 aumentou nos animais do grupo TC16 e diminuiu com o tratamento do grupo TN16. Diferenças na expressão de α -actina não foram observadas com o tratamento. Identificamos aumento de IGFR1 no grupo TC16 e diminuição deste no grupo TN16. Finalizando, nintedanibe levou ao atraso da progressão do câncer de próstata mais efetivamente nos camundongos com 12 semanas de idade, correlacionando isso à diminuição dos pontos de máxima vascularização, além da diminuição da severidade desse câncer na idade de 16 semanas. O complexo distroglicana se mostrou um indicador de progressão tumoral no modelo TRAMP, visto que sua restauração está relacionada à diminuição de adenocarcinoma bem diferenciado da próstata. Assim, concluímos que o

nintedanibe promoveu efeitos modulatórios sobre a progressão do câncer de próstata, em seus estágios iniciais, no lobo dorsolateral sendo expressivos na restauração estrutural do microambiente prostático.

ABSTRACT

Prostate cancer progression mechanism has been linked to different factors such as epithelial proliferation, tumor invasion ability and growth factors. Nintedanib (BIBF 1120) has been reported as a FGF and VEGF pathway inhibitor, exhibiting antitumor activity. And also, different animal experimental models have been used to cancer studies, including the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP). Thus, the aims of this study were to characterize the prostate morphology, as well as molecules involved in the structure of the basement membrane, extracellular matrix besides the angiogenesis and mitogenic process in the dorsolateral lobe of the prostate of TRAMP mice in early stages of tumor development, with and without nintedanib treatment. Therefore, 45 transgenic male mice (TRAMP) were divided in control groups: 8 week-old mice (TC8), 12 week-old mice (TC12) and 16 week-old mice (TC16) and treated groups with nintedanib at a dose of 10 mg/kg/day for 4 weeks and euthanized with 12 (TN12) and 16 (TN16) weeks of age. Samples from the dorsolateral lobe were collected and processed for light microscopy, immunohistochemistry, Western Blotting and microvessel density evaluation. The control groups: TC12 and TC16 showed predominance of two lesions; prostatic low-grade intraepithelial neoplasia (PIN) and high-grade intraepithelial neoplasia, respectively. Also, stromal hypertrophy and hyperplasia was identified in these both groups. Nintedanib treatment resulted in the increase of without lesion acini frequency and reduction low-grade PIN and maximum vascularization density in the TN12 group. Treatment led to decrease of well-differentiated adenocarcinoma and increase of α and β dystroglycans in the TN16 group which diminished in the control group (TC16). Decrease of laminin 1 in the control animals and increase after nintedanib treatment in the TN16 group was verified. In contrast, laminin 5 increased in TC16 group and decreased after nintedanib treatment in the TN16 group. There were no differences in α -actin expression with nintedanib treatment. The IGFR1 increased in TC16 group and decreased in TN16 group. To conclude, the nintedanib treatment delayed the prostate cancer progression, strongly in the 12 week old mice, in agreement with decrease of vascularization maximum points. The cancer severity decrease in 16 week old treated mice. The dystroglycan complex could be pointed to as a good indicator of tumor progression in the TRAMP model, considering the its restoration was associated to the reduction of prostate adenocarcinoma. We conclude that Nintedanib promoted modulatory effects on the cancer progression in early stages of the dorsolateral lobe, actually in the structural restoration of the prostate microenvironment.

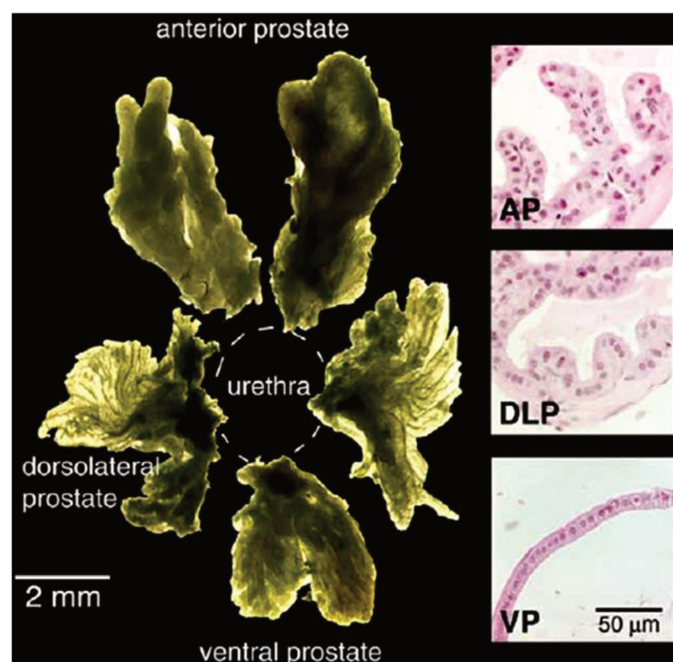
SUMÁRIO

1. RESUMO.....	8
2. ABSTRACT.....	10
3. INTRODUÇÃO.....	12
4. JUSTIFICATIVA.....	16
5. OBJETIVOS.....	17
5.1. Objetivo Geral.....	17
5.2. Objetivos Específicos.....	17
6. ARTIGO CIENTÍFICO.....	19
6.1 Resumo.....	20
6.2 Introdução.....	21
6.3 Material e Métodos.....	24
6.3.1 Animais e Procedimento Experimental.....	24
6.3.2 Microscopia de Luz.....	25
6.3.3 Análise da Densidade de Microvasos.....	26
6.3.4 Imunomarcagem das moléculas de: CD31, alfa-distroglicana (α -DG), laminina 5 (α 3), alfa actina (α -actina) e IGFR1.....	27
6.3.5 Extração de Proteínas e <i>Western Blotting</i>	28
6.3.6 Análise Estatística.....	29
6.4 Resultados.....	29
6.4.1 Análise Morfológica.....	29
6.4.2 Análises de Imunohistoquímica e <i>Western Blotting</i>	31
6.5 Discussão.....	44
6.6. Referências Bibliográficas.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
8. ANEXOS.....	59

3. INTRODUÇÃO

A próstata é uma glândula sexual acessória que é essencial para os processos reprodutivos, cuja secreção tem papel fundamental na motilidade dos espermatozoides (Elzanaty et al. 2002). De forma geral, a próstata de roedores, incluindo o camundongo, é uma glândula multilobulada dividida em quatro pares de lobos: anterior ou glândula de coagulação (LA), dorsal (LD), lateral (LL) e ventral (LV), situados ao redor da uretra prostática. Os lobos dorsal e lateral são frequentemente descritos em conjunto, e referidos como o lobo dorsolateral (LDL), pois compartilham um sistema de ducto comum (Sugimura et al. 1986; Marker et al. 2003).

Do ponto de vista microscópico, a próstata é composta por epitélio simples, revestido por células secretoras, basais e neuroendócrinas. As células epiteliais estão separadas do estroma adjacente por uma fina e contínua camada nomeada membrana basal, a qual é composta por diferentes elementos como laminina, colágeno IV e heparan sulfato (Marker et al. 2003; Yurchenco 2011).



Marker et al. 2003

A morfogênese, proliferação e manutenção da atividade funcional das células da próstata são reguladas por andrógenos, principalmente testosterona e dihidrotestosterona. Os andrógenos expressam seus efeitos biológicos através da interação com o receptor androgênico (AR) localizado no meio intracelular, sendo que o complexo receptor-hormônio

é translocado para o núcleo. Dessa forma, os hormônios esteróides regulam a sobrevivência das células epiteliais através de receptores estromais (Kurita et al. 2001; Ksing et al. 2001; Tindall e Rittmaster 2008).

Embora a próstata seja primariamente regulada por andrógenos, o seu desenvolvimento é sensível a outros hormônios, como os estrógenos, que podem atuar estimulando proliferação, tanto em condições normais como durante a formação de alterações lesivas. Os efeitos estrogênicos ocorrem através da ligação desses hormônios a receptores estrogênicos específicos α e β , os quais são predominantemente expressos no estroma e no epitélio, respectivamente (Lau et al. 2000; Ellem e Risbridger 2010).

Em países desenvolvidos, o câncer de próstata (CaP) é o câncer mais diagnosticado em homens (Torre et al. 2015). No Brasil, o CaP é o de maior incidência entre os homens em todas as regiões do país, sem considerar os tumores de pele não melanoma (INCA 2016). O CaP é considerado uma doença epitelial e seu desenvolvimento requer desequilíbrio hormonal e mudanças no microambiente prostático, como por exemplo, as que estão presentes na senescência (Olumi et al. 1999; Montico et al. 2011. Montico et al. 2015a).

A progressão tumoral está relacionada ao aumento do crescimento epitelial, morfologia tecidual neoplásica e habilidade invasiva que, no CaP, ocorrem através do aumento da angiogênese e processo de metástase (Gingrich et al. 1996; Olumi et al. 1999; Huss et al. 2001). Em vista disso, a literatura especializada evidencia que a interação entre estroma e epitélio desempenha papel crucial no crescimento e desenvolvimento do CaP. Os processos de crescimento, invasão tumoral e metástase envolvem mudanças na integridade e estrutura da matriz extracelular e membranas celulares para o destacamento e migração das células cancerígenas (Bostwick e Brawer 1987; Tuxhorn et al. 2002a; Niu e Xia 2009).

Componentes estromais do microambiente adjacente ao epitélio atuam coordenadamente quando o epitélio sofre danos. As alterações fenotípicas e genotípicas que ocorrem em resposta a esses danos, têm sido referidas como estroma reativo. Esse microambiente estromal tem sido apontado como importante fator para o crescimento e desenvolvimento do câncer (Barron e Rowley 2012). O estroma reativo é caracterizado pela presença de miofibroblastos, células que apresentam características em comum com fibroblastos e músculo liso (Krušlin et al. 2015).

Neste contexto, Montico e colaboradores demonstraram que a terapia anti-angiogênica diminuiu a expressão de marcadores do estroma reativo, como α -actina e vimentina, indicando a participação da angiogênese no desenvolvimento do estroma reativo (Montico et al. 2015b).

Além disso, fatores de crescimento fibroblásticos (FGF) e seus receptores (FGFR) são uma ampla família de polipeptídeos de crescimento que podem se ligar aos componentes da membrana basal, como heparan-sulfato, o qual desempenha importante papel em suas vias de sinalização. A maior fonte de FGF na próstata humana é o estroma onde atua como fator de crescimento parácrino para as células epiteliais. Os andrógenos podem interferir na resposta das células do CaP à sinalização de fatores de crescimento, promovendo a tumorigênese e metástase. Assim, alteração da expressão desses fatores pode ter uma variedade de efeitos, incluindo a proliferação de células, estimulação ou inibição de morte celular e ainda, prejudicando as interações entre o epitélio e o estroma (Giri et al. 1999; Powers et al. 2000; Zhu e Kyprianou 2008; Kwabi-Addo et al. 2004).

Com relação ao fator de crescimento homólogo à insulina (IGF), é conhecido que essa molécula apresenta efeitos mitogênicos, anti-apoptóticos e pró-tumorigênicos, inclusive na próstata. Estudos demonstram que o receptor de IGF1 (IGFR1) está expresso no CaP e que está associado ao grau de agressividade do tumor. Além disso, é conhecido que o LDL da próstata apresentou, no período da senescência, desequilíbrio caracterizado por lesões proliferativas, inflamação e aumento de IGFR1, assemelhando-se ao microambiente verificado em camundongos transgênicos para adenocarcinoma de próstata (TRAMP) (Cohen et al. 1991; Dunn et al. 1997; Ryan et al. 2007; Montico et al. 2014).

Hetzl e colaboradores, avaliando diferentes graus de CaP em homens, verificaram atividades opostas entre a vimentina e a α -actina associada a característica proliferativa dos miofibroblastos, indicando o papel fundamental dessas células na desorganização tecidual e no desenvolvimento do adenocarcinoma prostático. Também, os mesmos autores relataram aumento de FGF tanto nos tipos de lesões de baixo como de alto grau, bem como o envolvimento desses fatores com o início das alterações malignas (Hetzl et al. 2014).

No que se refere à distroglicana (DG), sabe-se que essa é uma proteína integral da membrana que se encontra expressa em uma variedade de tecidos, interagindo com proteínas extracelulares. A DG é formada por duas subunidades, a α e a β , que são traduzidas por um único mRNA, sendo posteriormente clivadas em duas proteínas associadas não covalentemente. Enquanto a subunidade α interage com laminina, perlecan, entre outros, a subunidade β se liga ao citoesqueleto (Brennan et al. 2004; Barresi e Campbell 2006).

Estudos têm relatado que a expressão da DG é regulada por andrógenos, reduzindo significativamente no CaP e sugerindo que essa ocorrência contribui para a desorganização da matriz extracelular e para a progressão dessa doença (Sgambato et al. 2007; Mitchell et al. 2013). Mitchell e colaboradores, através de estudos *in vitro* com

linhagens celulares do CaP, observaram que a perda da função da DG está associada ao aumento da tumorigenicidade e que a alteração da função da DG é uma consequência do fenótipo do câncer (Mitchell et al. 2013). Em adição, a literatura especializada demonstra que a DG desempenha papéis importantes nas respostas entre as células epiteliais e membrana basal, incluindo controle do crescimento, organização do citoesqueleto e polaridade celular (Muschler et al. 2002).

Shimojo e colaboradores, demonstraram que ocorre redução da glicosilação de α -DG em células de carcinoma de próstata diminuindo os níveis proteicos da dessa subunidade, o que está associado ao aumento de invasão de células epiteliais no estroma. Em adição, o grupo reportou que a associação da laminina com α -DG na lamina basal de células neoplásicas do tecido prostático está ausente (Shimojo et al. 2011). Além disso, a literatura relata a redução de β -DG em diferentes tipos de câncer (Cross et al. 2008).

Com relação a lamina, é conhecido que essa é representada por uma família de proteínas heterotriméricas com subunidades $\alpha\beta\gamma$, encontrada na membrana basal, onde se liga aos componentes dessa estrutura como heparan sulfato, colágeno tipo IV, dentre outros (Domogatskaya et al. 2012). Ainda, durante a invasão tumoral ocorre perda da barreira da membrana basal, onde é observado padrão descontínuo da marcação de laminina. Em adição, estudos demonstraram que a ligação da laminina com α -DG pode desempenhar a função de supressão tumoral (Kleinman e Weeks 1989; Patarroyo et al. 2002; Bao et al. 2009). Nesse contexto, diversos modelos experimentais têm sido desenvolvidos para estudar os aspectos biológicos e genéticos do desenvolvimento do CaP (Chiaverotti et al. 2008).

O camundongo TRAMP é um desses modelos animais que são frequentemente utilizados no estudo do CaP. No modelo TRAMP, o antígeno SV40 é expresso em células epiteliais secretoras da próstata sob o controle do gene promotor andrógeno-sensível probasina de rato. Nos TRAMP, as lesões desenvolvem-se de forma progressiva, multifocal e heterogênea assemelhando-se ao CaP clínico com relação à progressão, independência de andrógeno e a bioquímica (Greenberg et al. 1995; Foster et al. 1997; Kaplan-Lefko et al. 2003).

O modelo TRAMP desenvolve formas progressivas do CaP durante seu tempo de vida, sendo que a neoplasia intraepitelial prostática (NIP) pode apresentar-se entre 6 e 12 semanas de idade e todos os animais exibem tumores primários e metastáticos entre 18 e 24 semanas, sobretudo no LDL da próstata. A partir de 30 semanas, esses animais apresentam metástases para nódulos linfáticos e/ou pulmões bem como invasão das vesículas seminais,

sendo que sua sobrevida varia de 50 à 54 semanas de idade (Greenberg et al. 1995; Gingrich et al. 1996).

Também, o TRAMP tem sido utilizado em estudos de moléculas envolvidas na angiogênese, um importante processo presente na progressão do CaP. Entre essas moléculas estão FGF (Polnaszek et al. 2003), fator de crescimento homólogo a insulina (Kaplan et al. 1999) e fator de crescimento endotelial (Huss et al. 2001). A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes e desempenha importante papel no crescimento tumoral, iniciando com a degradação da membrana basal por células endoteliais que posteriormente migram (Weidner et al. 1993).

Considerando a importância da angiogênese na progressão tumoral, estudos tem focado suas análises na inibição dos principais reguladores do processo da angiogênese, envolvendo uma cascata de receptores de FGF, PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular). Diferentes estudos vêm sendo realizados utilizando o nintedanibe (BIBF1120), um inibidor anti-angiogênico da classe das tirosino-quinases, na terapia de diferentes tipos de câncer (Awasthi e Schwarz 2015). O nintedanibe difere de outros inibidores da angiogênese não apenas pelo seu perfil triplo-inibidor, mas também na duração da sua ação celular (Capdevila et al. 2014). Ainda, no câncer de colo retal, essa droga apontou boa tolerância e bom bloqueio na via de sinalização de FGF (Hilberg et al. 2008; Capdevila et al. 2014).

Kutluk e colaboradores demonstraram que o nintedanibe interrompeu a transição epitélio-mesenquimal em modelos de câncer de pulmão e pâncreas (Kutluk et al. 2013). Em adição, a administração de nintedanibe exerceu efeitos na reversão da transição epitélio-mesenquimal através da restauração da expressão de E-caderina via regulação de dois genes mesenquimais além de apresentar efeitos anti-fibróticos e anti-inflamatórias em doenças estromais (Wollin et al. 2014; Huang et al. 2015; Rangarajan et al. 2016).

Segundo Kudo e colaboradores, o nintedanibe apresentou potentes atividades antitumorais e anti-angiogênicas no tratamento de hepatocarcinoma *in vivo* (Kudo et al. 2011). Ainda, BIBF 1120 se mostrou eficiente na diminuição do crescimento tumoral nas doses de 100/mg/kg/dia, 50/mg/kg/dia e 10mg/kg/dia em camundongos inoculados com células humanas de carcinoma da cabeça e do pescoço (Hilberg et al. 2008).

4. JUSTIFICATIVA

A próstata é um dos órgãos mais acometidos por lesões tanto malignas quanto benignas, além disso, destacamos seu fundamental papel no processo reprodutivo masculino. Isto posto, diferentes estudos vêm sendo desenvolvidos sobre a biologia celular, molecular e endocrinológica desse órgão. A interação entre epitélio e estroma da próstata, bem como a importância e manutenção da integridade da membrana basal são indicados como importantes fatores para o desenvolvimento e progressão tumoral nessa glândula, embora poucos estudos tenham detalhado o comportamento dos elementos estruturais nos diferentes estágios do câncer de próstata. Além disso, existem relatos na literatura que apontam o envolvimento dos fatores de crescimento fibroblásticos tanto no desenvolvimento quanto na progressão tumoral. Assim, a avaliação de drogas que interfiram nas vias de funcionamento desses fatores é promissora para o desenvolvimento de terapias destinadas ao tratamento do câncer de próstata, bem como a caracterização de diferentes elementos importantes para estrutura e funções celulares, incluindo moléculas de adesão, membrana basal, dentre outros, que são fundamentais para a avaliação da eficiência de drogas tanto para o desenvolvimento quanto para a progressão tumoral.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral:

O principal objetivo do presente estudo foi caracterizar a morfologia, além de moléculas envolvidas na estrutura da membrana basal, matriz extracelular, bem como nos processos de angiogênese e mitogênese no lobo dorsolateral da próstata de camundongos transgênicos para o adenocarcinoma de próstata em diferentes estágios iniciais de desenvolvimento tumoral, com e sem tratamento com a droga nintedanibe.

5.2 Objetivos específicos:

- a) Caracterizar a estrutura do lobo dorsolateral da próstata de animais TRAMP em diferentes estágios da progressão do câncer com e sem tratamento com a droga nintedanibe;
- b) Imunolocalizar as moléculas de α -dístroglicana, laminina 5, α -actina e IGFR1 no lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP, em diferentes estágios de progressão tumoral, com e sem tratamento com a droga nintedanibe;

c) Quantificar o nível proteico de β -distroglicana, laminina 1, α -actina e IGFR1, no lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP, transgênico para o adenocarcinoma de próstata em diferentes estágios de progressão tumoral, com e sem tratamento com a droga nintedanibe;

d) Determinar a densidade de microvasos através da imunolocalização de CD31 no lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP, em diferentes estágios de progressão tumoral, com e sem tratamento com a droga nintedanibe.

6. ARTIGO CIENTÍFICO

Resposta da Matriz Extracelular e Angiogênese no Adenocarcinoma de Próstata em Camundongos TRAMP frente ao tratamento com Nintedanibe

¹Ellen Nogueira Pangrazi, ¹Raquel Frenedoso Silva MSc, ¹Larissa Akemi Kido MSc, ¹Fabio Montico PhD, ¹Valéria Helena Alves Cagnon PhD

¹ Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil

Ellen Nogueira Pangrazi: ellen_lima48@hotmail.com

Raquel Frenedoso Silva: raquelfrenedoso@yahoo.com.br

Larissa Larissa Akemi Kido: larissa.kido@gmail.com

Fabio Montico: fabio260687@gmail.com

Autor de correspondência: Valéria Helena Alves Cagnon PhD, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, 13083-865, Campinas, São Paulo, Brasil. Telefone: (+55) (19) 3521-6103. Fax: (+55) (19) 3289-3124. E-mail quitete@unicamp.br

Palavras chaves: Nintedanibe, TRAMP, Anti-angiogênico, Próstata

Artigo em fase de tradução para ser enviado para o periódico Histochemistry and Cell Biology

6.1. Resumo

A progressão do câncer de próstata depende da proliferação epitelial, habilidade invasiva, além de fatores de crescimento. Nintedanibe (BIBF 1120) tem sido relatado como inibidor das vias de FGF e VEGF, exibindo atividades antitumorais. Em adição, o camundongo transgênico para adenocarcinoma de próstata (TRAMP) é um modelo frequentemente utilizado no estudo do câncer de próstata. Assim, o presente estudo objetivou caracterizar a morfologia, além de moléculas envolvidas na estrutura da membrana basal, matriz extracelular, bem como nos processos de angiogênese e mitogênico no lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP em diferentes estágios iniciais de desenvolvimento tumoral, com e sem tratamento com a droga nintedanibe. Para tanto, 45 camundongos machos transgênicos da linhagem TRAMP foram divididos em: grupos controles, eutanasiados com 8 (TC8), 12 (TC12) e 16 (TC16) semanas de idade e grupos tratados com nintedanibe na dose de 10 mg/Kg/dia durante 4 semanas e eutanasiados com 12 (TN12) e 16 (TN16) semanas de idade. O lobo dorsolateral dos camundongos dos grupos experimentais foi coletado para a avaliação de microscopia de luz, imunohistoquímica, *Western Blotting* e análise da densidade de microvasos. Os grupos controles TC12 e TC16 apresentaram predominância de neoplasia intraepitelial prostática (NIP) de baixo e alto grau, respectivamente. O tratamento com nintedanibe aumentou a frequência de áreas sem lesão, além de diminuir NIP de baixo grau e densidade de máxima vascularização no grupo TN12. Em adição, nintedanibe diminuiu a ocorrência de adenocarcinoma bem diferenciado e aumentou α e β distroglicanas, no grupo TN16, sendo que estes últimos estavam diminuídos no grupo TC16. Também, a laminina 1 diminuiu nos animais controles TRAMP e aumentou com o tratamento no grupo TN16. Em contraste, a laminina 5 aumentou nos animais do grupo TC16 e diminuiu com o tratamento do grupo TN16. Diferenças na expressão de α -actina não foram observadas com o tratamento. Identificamos aumento de IGFR1 no grupo TC16 e diminuição deste no grupo TN16. Assim, concluímos que nintedanibe levou ao atraso da progressão do câncer de próstata mais efetivamente nos camundongos com 12 semanas de idade, além da diminuição da severidade desse câncer na idade de 16 semanas. O complexo distroglicana se mostrou um indicador de progressão tumoral no modelo TRAMP, visto que sua restauração está relacionada à diminuição de adenocarcinoma bem diferenciado da próstata. Concluímos que o nintedanibe promoveu efeitos modulatórios sobre a progressão do câncer no lobo dorsolateral em seus estágios iniciais, sendo expressivos na restauração estrutural do microambiente prostático.

6.2. Introdução

A próstata é uma glândula sexual acessória que é essencial para os processos reprodutivos, cuja secreção tem papel fundamental na motilidade dos espermatozoides (Elzanaty et al. 2002). De forma geral, a próstata de roedores, incluindo o camundongo, é uma glândula multilobulada, dividida em quatro pares de lobos; anterior ou glândula de coagulação (LA), dorsal (LD), lateral (LL) e ventral (LV), situados ao redor da uretra prostática. Os lobos dorsal e lateral são frequentemente descritos em conjunto, e referidos como o lobo dorsolateral (LDL), pois compartilham um sistema de ducto comum (Marker et al. 2003; Sugimura et al. 1986).

Em países desenvolvidos, o câncer de próstata (CaP) é o câncer mais frequentemente diagnosticado em homens (Torre et al. 2015). É conhecido que a progressão tumoral está relacionada ao aumento do crescimento epitelial, levando a morfologia tecidual neoplásica, além da habilidade invasiva e aumento dos processos de angiogênese e metástase na próstata (Gingrich et al. 1996; Huss et al. 2001; Olumi et al. 1999).

Em vista disso, a literatura especializada evidencia que a interação entre estroma e epitélio desempenha papel crucial no crescimento e desenvolvimento do CaP. Os processos de crescimento, invasão tumoral e metástase envolvem mudanças na integridade e estrutura da matriz extracelular e membranas celulares para o destacamento e migração das células cancerígenas (Bostwick and Brawer 1987; Niu and Xia 2009; Tuxhorn et al. 2002a).

Nesse contexto, os componentes estromais do microambiente adjacente ao epitélio atuam coordenadamente quando o epitélio sofre danos, sendo eles malignos ou não. As alterações fenotípicas e genotípicas que ocorrem em resposta a esses danos, têm sido referidas como estroma reativo. Esse microambiente estromal tem sido apontado como importante fator para o crescimento e desenvolvimento do câncer (Barron and Rowley 2012). O estroma reativo é caracterizado pela presença de miofibroblastos, células que apresentam características em comum com fibroblastos e músculo liso e estão relacionadas com o carcinoma (Krušlin et al. 2015).

Montico e colaboradores demonstraram que a terapia anti-angiogênica diminuiu a expressão de marcadores do estroma reativo, α -actina e vimentina, indicando a participação da angiogênese no desenvolvimento do estroma reativo.

Estudos têm relatado que a expressão da distroglicana (DG) é regulada por andrógenos e reduz significativamente no CaP, sugerindo que essa ocorrência contribui para a desorganização da matriz extracelular e para a progressão dessa doença (Mitchell et al. 2013;

Sgambato et al. 2007). A DG é formada por duas subunidades, a α e a β , que são traduzidas por um único mRNA e posteriormente é clivada em duas proteínas associadas não covalentemente (Barresi and Campbell 2006; Brennan et al. 2004). Mitchell e colaboradores, através de estudos *in vitro* com linhagens celulares do CaP, observaram que a perda da função da DG está associada ao aumento da tumorigenicidade e que a alteração da função da DG é uma consequência do fenótipo do câncer (Mitchell et al. 2013). Ainda, a literatura especializada demonstrou que a DG desempenha papéis importantes nas respostas entre as células epiteliais e membrana basal, incluindo controle do crescimento, organização do citoesqueleto e polaridade celular (Muschler et al. 2002).

Já a laminina é uma família de proteínas heterotriméricas com subunidades $\alpha\beta\gamma$, encontrada na membrana basal onde se liga aos componentes dessa estrutura (heparan sulfato, colágeno tipo IV, etc). Durante a invasão tumoral, ocorre perda da barreira da membrana basal onde é observado um padrão descontínuo da marcação de laminina. Ainda, autores indicam que a ligação da laminina com α -DG pode desempenhar a função de supressão tumoral (Bao et al. 2009; Kleinman and Weeks 1989; Patarroyo et al. 2002).

Além disso, é conhecido que fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) e seus receptores (FGFR) são uma ampla família de polipeptídeos de crescimento que podem se ligar aos componentes da membrana basal, como heparan-sulfato, o qual desempenha importante papel em suas vias de sinalização. A maior fonte de FGF na próstata humana é o estroma onde atua como fator de crescimento parácrino para as células epiteliais. A alteração da expressão desses fatores pode ter uma variedade de efeitos, incluindo a proliferação de células, estimulação ou inibição de morte celular e ainda, prejudicando as interações entre o epitélio e o estroma (Giri et al. 1999; Kwabi-Addo et al. 2004; Powers et al. 2000; Zhu and Kyprianou 2008).

Com relação ao fator de crescimento homologia à insulina (IGF), é conhecido que apresenta efeitos mitogênicos, anti-apoptóticos e pró-tumorigênicos, inclusive na próstata. Estudos demonstram que o receptor de IGF1 (IGFR1) está expresso no CaP e metástase e que está associado ao grau de agressividade do tumor. Além disso, o LDL da próstata apresentou, na senescência, desequilíbrio caracterizado por lesões proliferativas, inflamação e aumento de IGFR1, assemelhando-se ao microambiente verificado em doenças dos camundongos transgênicos para adenocarcinoma de próstata (TRAMP) (Cohen et al. 1991; Dunn et al. 1997; Montico et al. 2014; Ryan et al. 2007).

Nesse contexto, diversos modelos experimentais têm sido desenvolvidos para estudar os aspectos biológicos e genéticos do desenvolvimento do CaP. (Chiaverotti et al.

2008). O camundongo TRAMP é um desses modelos animais que são frequentemente utilizados no estudo do CaP, onde o antígeno SV40 é expresso em células epiteliais secretoras da próstata dos TRAMP sob o controle do gene promotor andrógeno-sensível probasina de rato. Nos animais TRAMP, as lesões desenvolvem-se de forma progressiva, multifocal e heterogênea assemelhando-se ao CaP clínico com relação à progressão, independência de andrógeno e a bioquímica (Foster et al. 1997; Greenberg et al. 1995; Kaplan-Lefko et al. 2003).

Também, o modelo TRAMP tem sido utilizado em estudos de moléculas envolvidas na angiogênese, um importante processo presente na progressão do CaP, entre essas moléculas estão FGF (Polnaszek et al. 2003), IGF (Kaplan et al. 1999) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Huss et al. 2001). A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existent e desempenha um importante papel no crescimento tumoral, iniciando com a degradação da membrana basal por células endoteliais que posteriormente migram (Weidner et al. 1993).

Assim, considerando a importância da angiogênese na progressão tumoral, estudos tem se voltado para a inibição de seus principais reguladores, uma cascata de receptores de FGF, VEGF e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Diferentes estudos vêm sendo realizados utilizando o nintedanibe (BIBF1120), um inibidor anti-angiogênico da classe das tirosino-quinases, em diferentes tipos de câncer. No câncer de colo retal, essa droga apontou boa tolerância e bom bloqueio na via de sinalização de FGF. O nintedanibe difere de outros inibidores da angiogênese não apenas pelo seu perfil triploinibidor, mas também na duração da sua ação celular (Capdevila et al. 2014; Hilberg et al. 2008).

Kutluk e colaboradores demonstraram nintedanibe interrompeu a transição epitélio-mesenquima em modelos de câncer de pulmão e pâncreas (Kutluk Cenik et al. 2013). Em adição, o nintedanibe exerceu efeitos na reversão da transição epitélio-mesenquimal através da restauração da expressão da E-caderina via regulação de dois genes mesenquimais, além de apresentar efeitos anti-fibróticos e anti-inflamatórias em doenças estromais (Huang et al. 2015; Rangarajan et al. 2016; Wollin et al. 2014).

Segundo Kudo e colaboradores nintedanibe apresentou potentes atividades antitumorais e antiangiogênicas no tratamento de hepatocarcinoma *in vivo* (Kudo et al. 2011). Ainda, BIBF 1120 se mostrou eficiente na diminuição do crescimento tumoral nas doses de 100/mg/kg/dia, 50/mg/kg/dia e 10mg/kg/dia em camundongos inoculados com células humanas de carcinoma da cabeça e do pescoço (Hilberg et al. 2008).

Assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a morfologia, além de moléculas envolvidas na estrutura da membrana basal, matriz extracelular, bem como nos processos de angiogênese e mitogênese no LDL da próstata de camundongos transgênicos para o adenocarcinoma de próstata em diferentes estágios iniciais de desenvolvimento tumoral, com e sem tratamento com a droga Nintedanibe.

6.3 Material e Métodos

6.3.1. Animais e Procedimento Experimental

No presente trabalho foram utilizados 45 camundongos machos transgênicos da linhagem TRAMP (C57BL/6-Tg (TRAMP)8247Ng/J X FVB/NJ) F1/J) obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Todos os animais obtidos do CEMIB receberam água e ração *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil) e foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Celular e Estrutural (Área de Anatomia) do Instituto de Biologia até atingirem a idade experimental para cada grupo de tratamento. Todos os cruzamentos e tipagem genotípica para garantir que ocorreu a instalação da transgene foram realizados no CEMIB/UNICAMP. Os camundongos da linhagem TRAMP foram importados da *The Jackson Laboratory* com posterior instalação da colônia no CEMIB/UNICAMP com financiamento da FAPESP (Projeto 2010/51112-5). Os animais tratados receberam 10mg/Kg/dia de nintedanibe, o qual foi obtido pela empresa APExBIO An Apoptosis and Epigenetics Company, seguindo a metodologia experimental modificada de (Hilberg et al. 2008) e (Bousquet et al. 2011). Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (Figura 1) (n=9):

- **Grupo TRAMP Controle 8 (TC8)**: Camundongos TRAMP eutanasiados com 08 semanas de idade.
- **Grupo TRAMP Controle 12 (TC12)**: Camundongos TRAMP com 08 semanas de idade, que receberam veículo (Tween 20 - 10%), via gavagem, sendo administrado 5 doses durante 4 semanas e eutanasiados com 12 semanas de idade.
- **Grupo TRAMP Controle 16 (TC16)**: Camundongos TRAMP com 12 semanas de idade, que receberam veículo (Tween 20 - 10%), via gavagem, sendo administrado 5 doses durante 4 semanas e eutanasiados com 16 semanas de idade.

- **Grupo TRAMP Nintedanibe 12 (TN12):** Camundongos TRAMP com 08 semanas de idade, tratados com nintedanibe (10mg/Kg/dia) diluído em Tween 20 (10%) via gavagem, sendo administrado 5 doses durante 4 semanas e eutanasiados com 12 semanas de idade.
- **Grupo TRAMP Nintedanibe 16 (TN16):** Camundongos TRAMP com 12 semanas de idade, tratados com nintedanibe (10mg/Kg/dia) diluído em Tween 20 (10%) via gavagem, sendo administrado 5 doses durante 4 semanas e eutanasiados com 16 semanas de idade.

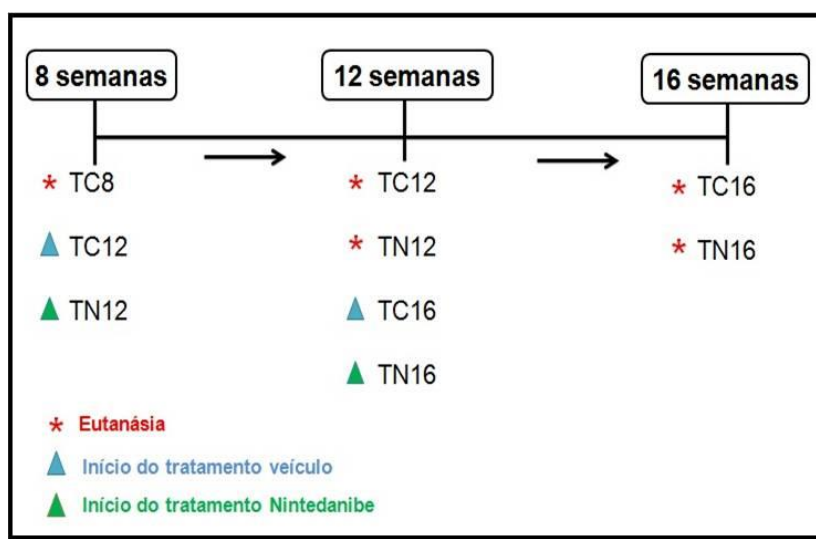


Figura 1: Representação esquemática do delineamento experimental.

Após atingirem as idades nos diferentes grupos experimentais, os animais foram pesados em balança analítica *Denver P-214* (*Denver Instrument Company, Arvada, CO, EUA*), anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (5mg/kg i.m.; *König, São Paulo, Brasil*) e Cloridrato de Cetamina 10% (60mg/kg, i.m.; *Fort Dodge, Iowa, EUA*) e eutanasiados. Amostras do lobo dorsolateral da próstata foram coletadas e submetidas às análises morfológica, através de microscopia de luz, imunohistoquímica e *Western Blotting*. Todo o experimento foi realizado através das normas vigentes de experimentação animal (Protocolo CEUA/Unicamp nº 3649-1).

6.3.2. Microscopia de Luz

Amostras do lobo dorsolateral da próstata de 5 animais de cada grupo foram coletadas e fixadas em solução de Bouin. 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 em xilol por 2 horas e inclusos em *paraplast* (*Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA*). Em seguida, os materiais foram seccionados no micrótomo *Hyrax M60* (*Zeiss, Munique, Alemanha*) com espessura de 5µm, corados em Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson (Junqueira et al. 1979) e fotografados no fotomicroscópio *Nikon Eclipse E-400* (*Nikon, Tóquio, Japão*).

Em seguida, 8 regiões aleatórias foram utilizadas para a quantificação dos diferentes tipos de lesões morfológicas. Para tal, em cada uma das 8 regiões foram demarcadas em 4 quadrantes. Em cada quadrante o tecido prostático foi classificado em epitélio sem lesão, em NIP de baixo grau, em NIP de alto grau e em adenocarcinoma bem-diferenciado. Ao final, um total de 160 quadrantes foram analisados por grupo (modificado de (Kido et al. 2016).

6.3.3. Análise da densidade de microvasos

A determinação da densidade de microvasos foi realizada através da contagem da frequência de marcação positiva de CD31 em vasos sanguíneos na região estromal glandular, adjacente ao epitélio ou não de 5 animais em cada um dos grupos experimentais. Para tal, foram utilizadas 8 regiões aleatórias de cada um dos 5 animais submetidos a imunohistoquímica para CD31, utilizando objetiva de 40X. O LDL da próstata foi avaliado no fotomicroscópio (*Nikon Eclipse E-400*), utilizando o programa *Nis-Elements: Advanced Research* (USA) para a contagem de microvasos positivos para CD31. O critério para tal contagem, baseou-se em Weidner et al. 1993, onde qualquer célula ou grupo de células endoteliais com coloração acastanhada, nitidamente distintos de microvasos adjacentes e de outros elementos de tecido conjuntivo foram considerados como microvasos contabilizáveis. Além disso, a presença de lúmen não foi necessária para que uma estrutura seja definida como um microvaso (Weidner et al. 1993). A densidade de microvasos foi expressa através da média obtida após o procedimento de contagem, além da densidade máxima (Hochberg et al. 2002; Montico et al. 2015).

6.3.4. Imunomarcação das moléculas de: CD31, alfa-distroglicana (α -DG), laminina 5 (α 3), alfa actina (α -actina) e IGFRI

Amostras do LDL de 4 animais de cada grupo experimental foram coletadas (os mesmos utilizados para microscopia de luz). A seguir, cortes do tecido prostático com cinco micrômetros de espessura foram obtidos no micrótomo (Hyrax M60, Zeiss, Alemanha) e coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C por 15 minutos em microondas (potência de 750 W) ou tratamento com proteinase K, dependendo das características de cada anticorpo. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H₂O₂ (0,3% em metanol) por 15 minutos, com posterior incubação em solução bloqueadora com albumina soro bovino (3%), em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os antígenos CD31, alfa distroglicana (α -DG), laminina 5 (α 3), α -actina e IGFR1 foram localizados através dos anticorpos: policlonal *rabbit* H0410 (SC-1506) para CD31, policlonal *rabbit* H-300 (sc-28534) (Santa Cruz Biotchnollogy) para alfa distroglicana (α -DG), policlonal *rabbit* H-187 (sc-20143) (Santa Cruz Biotchnollogy) para laminina α 3, policlonal *rabbit* (ab5694) (*Abcam*, EUA) para α -actina, policlonal *rabbit* N-20 (sc-720) (Santa Cruz Biotchnollogy) para IGFR1, diluídos (1:50) em BSA 1% e armazenados *overnight* a 4 °C. O *kit* Envision HRP (Dako Cytomation Inc., Carpinteria, CA, USA) foi usado para detecção dos antígenos, de acordo com as instruções do fabricante. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário HRP conjugado proveniente do *kit* Envision (Dako) por 40 minutos e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB). Para a contra-coloração destes foi utilizado Hematoxilina de Harris. As lâminas foram desidratadas, montadas e avaliadas no fotomicroscópio. Os cortes prostáticos de cada grupo foram avaliados através do precipitado acastanhado de DAB, o qual indica a imunoreatividade positiva dos anticorpos. Para a quantificação de imunoreatividade positiva para alfa-distroglicana (α -DG), laminina 5 (α 3), alfa actina (α -actina) e IGFR1, 8 regiões aleatórias foram utilizadas de 4 animais de cada um dos grupos experimentais, sendo avaliados através de objetiva de 40X. Destaca-se que a quantificação para laminina 5 (α 3) foi particularmente realizada na região estromal adjacente ao ácino glandular. O tecido prostático foi avaliado no fotomicroscópio utilizando o programa Nis-Elements: Advanced Research (USA). Posteriormente, o retículo de 160 pontos foi utilizado proveniente do programa Image Pro Plus, para contagem dos pontos correspondentes à imunomarcção positiva, modificado de (Mandarin-de-Lacerda 1995).

6.3.5. Extração de Proteínas e Western Blotting

Amostras do lobo dorsolateral da próstata foram coletadas de 4 animais de cada grupo experimental, pesadas e homogeneizadas através do homogeneizador Polytron (Kinematica) por 1 min em 50 µl/mg de tampão de extração RIPA contendo 10% (v/v) Triton X-100 and 10 µl/ml de *cocktail* inibidor de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). Os extratos dos tecidos foram obtidos por centrifugação durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. Uma alíquota de cada amostra foi usada para determinação da concentração de proteínas, usando o reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif., USA). As amostras foram misturadas (1:1) com tampão de amostra 3X (100mM Tris-HCl pH 6.8, 10%β-mercaptoetanol, 4% SDS and 20% glycerol), incubadas em banho seco a 95°C por 5 minutos, rapidamente congeladas e armazenadas a -70°C até o momento do uso. O correspondente a 50 microgramas de proteínas foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente (Sistema Hoefer) para membranas de nitrocelulose (Amersham) a 70 V por 3 horas. As membranas foram então bloqueadas com 3% BSA diluído em TBS-T por uma hora e incubadas com os anticorpos primários; monoclonal *rabbit* H-242 (sc-28535) (Santa Cruz Biotchenollogy) para beta distroglicana (β-DG), policlonal *rabbit* N-20 (sc-720) (Santa Cruz Biotchenollogy) para IGFR1, monoclonal *mouse* (ab7817) (*Abcam*, EUA) para α-actina, policlonal *rabbit* (L9393) (Sigma- Aldrich) para laminina 1 na diluição 1:500. Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários *anti-rabbit* e *anti-mouse* na diluição de 1:2000 em 1% BSA. Após nova série de lavagens com TBS-T, a atividade da peroxidase foi detectada através da incubação das membranas com solução quimioluminescente (Pierce Biotechnology, Rockford, 500 ml) por 5 minutos, seguido pela captura da fluorescência através do equipamento Gene Gnome e do programa Gene Syns (Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK). O anticorpo para β-actina, mouse monoclonal anti-b-actin (sc- 81,178) (Santa Cruz Biotechnology, CA) foi utilizado como controle endógeno para comparação entre os grupos experimentais. A intensidade dos antígenos das bandas em cada grupo experimental foi determinada por densitometria através do programa Image J (Image Analysis e processado em Java) e foi expressa como média percentual ± desvio padrão em relação à intensidade da banda de β-actina para cada um dos grupos experimentais.

6.3.6 Análise Estatística

Os parâmetros quantificados na morfologia, imunohistoquímica, *Western Blotting* e na determinação da densidade de microvasos foram analisados estatisticamente para os diferentes grupos. Para análise estatística foram empregados o Test-T de Student e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação entre médias. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5% (Zar 1999).

6.4 Resultados

6.4.1. Análise Morfológica

Grupo TRAMP Controle 8 (TC8)

O lobo dorsolateral dos camundongos com 8 semanas de idade apresentou ácinos com frequente pregueamento na mucosa. O epitélio secretor caracterizou-se pela variação de células cúbicas com núcleos centrais e células colunares com núcleos basais. A ocorrência de NIP de baixo grau foi identificada, cujas células demonstraram núcleos e nucléolos proeminentes, caracterizando proliferação celular, conforme apresentado na Figura 2 a. O estroma prostático mostrou-se composto por células musculares lisas alongadas entremeadas a componentes fibrilares delgados, os quais se encontraram organizados concentricamente ao redor dos ácinos, além de vasos sanguíneos (Figura 2 b).

Grupo TRAMP Controle 12 (TC12)

O epitélio prostático do LDL dos camundongos com 12 semanas de idade mostrou aspectos morfológicos semelhantes aos encontrados no grupo TC8, porém, com aumento da frequência das alterações. Presença de NIP de alto grau foi identificada com padrão cribriforme, o qual é caracterizado por arranjo arquitetural em forma de crivo em direção ao lúmen glandular. A membrana basal apresentou-se íntegra, não se identificando pontos de descontinuidade. As células secretoras apresentaram citoplasma e núcleo aumentados e este último se mostrou menos acidófilo conforme pode ser visto na Figura 2 c. Aparente aumento dos componentes estromais fibrilares foi observado. Ainda, células musculares lisas hipertróficas e hiperplásicas foram verificadas no estroma prostático (Figura 2 d).

Grupo TRAMP Controle 16 (TC16)

As características do epitélio glandular dos camundongos com 16 semanas de idade, apesar de se mostrarem semelhantes àquelas encontradas nos grupos TC8 e TC12, apresentaram intensificação da frequência de alterações. O epitélio secretor mostrou pontos de adenocarcinoma bem diferenciado, com células apresentando núcleos basais de menor intensidade de acidofilia que os grupos anteriores. O adenocarcinoma foi caracterizado pela invasão de células epiteliais no estroma glandular através de pontos de descontinuidade da membrana basal em direção ao estroma prostático (Figura 2 e). Também, o estroma do grupo TC16 apresentou aumento acentuado dos componentes estromais fibrilares e celulares quando comparado aos demais grupos experimentais, caracterizando hipertrofia estromal (Figura 2 f).

Grupo TRAMP Nintedanibe 12 (TN12)

Os camundongos do grupo TN12 tratados com Nintedanibe apresentaram maior frequência de áreas glandulares com ácinos sem lesão, e redução significativa de NIP de baixo grau quando comparados ao grupo TC12 (Figuras 2 g e 3 a, b). Em relação à NIP de alto grau e ao adenocarcinoma bem diferenciado, não houve diferença estatística significativa (Figura 3 c, d) quando comparado ao grupo controle de mesma idade. Ainda, o compartimento estromal apresentou elementos fibrilares e células musculares lisas delgados, em relação ao grupo TC12. Todos esses componentes se encontraram distribuídos ao redor dos ácinos sendo que as células musculares lisas não se mostraram hipertróficas (Figura 2 h).

Grupo TRAMP Nintedanibe 16 (TN16)

O LDL dos camundongos com 16 semanas de idade também demonstrou maior incidência de epitélio secretor sem lesão em relação ao grupo TC16 (Figuras 2 i; 3 a). A frequência relativa de NIP, tanto de baixo como de alto grau entre os grupos controle e tratado, não apresentou diferença estatisticamente significante (Figura 3 b, c). No entanto, diminuição significativa de adenocarcinoma bem diferenciado foi verificada (Figura 3 d). Em relação ao estroma, diferenças morfológicas nos constituintes fibrilares e celulares não foram verificadas, quando comparado ao grupo controle, caracterizando persistência de células musculares lisas hipertróficas e hiperplásicas interposto por espessamento dos elementos fibrilares, assim como caracterizado no grupo TC16 (Figura 2 j).

6.4.2 Análises de imunohistoquímica e Western Blotting

Grupo TRAMP Controle 8 (TC8)

A densidade de máxima vascularização verificada através da imunomarcção e contagem de CD31 no lobo dorsolateral da próstata de camundongos com 8 semanas de idade foi de 8,8 e a média obtida foi de 5,2 (Figura 4 a, f, g). Com relação à imunomarcção de α -DG, essa foi verificada na região apical das células epiteliais, apresentando 70% de frequência (Figura 5 a, f). A análise dos níveis proteicos de β -DG foi de 13,3% em relação ao controle endógeno de β -actina no grupo TC8 (Figura 6 a). Com relação à quantificação proteica de laminina 1, este grupo apresentou 378% de nível proteico em relação ao controle endógeno de β -actina (Figura 6 b). A análise imunohistoquímica da laminina 5 mostrou 19,4% de imunoreatividade positiva na região da membrana basal, sendo que a imunomarcção positiva apresentou áreas de descontinuidade (Figura 7 a, f). Intensa imunoreatividade positiva para α -actina foi verificada ao redor dos ácinos prostáticos do grupo TC8, com valor representando 68,4% (Figura 8 a, f) e os níveis de proteína de α -actina foi de 33,3%, em relação ao controle endógeno de β -actina no grupo TC8 (Figura 9 a). Com relação ao IGFR1, a quantificação proteica representou 69,3% em relação ao controle endógeno β -actina (Figura 9 b) e a imunoreatividade para essa molécula foi de 24,2% no estroma e 22,6% no epitélio glandular (Figura 10 a, f, g).

Grupo TRAMP Controle 12 (TC12)

O LDL do grupo TC12 não apresentou diferença estatisticamente significativa, em relação ao grupo com 8 semanas de idade (TC8), na densidade de máxima vascularização e média de microvasos (Figura 4 b, f, g). Com relação à imunomarcção de α -DG, esta se mostrou semelhante ao grupo TC8, sem diferença estatisticamente significativa (Figura 5 b, f), bem como a quantificação de nível proteico de β -DG (Figura 6 a). A quantificação proteica de laminina 1 apresentou diminuição significativa desta molécula em comparação ao grupo TC8 (Figura 6 b). No entanto, a imunomarcção de laminina 5 não apresentou diferenças significativas entre os grupos TC8 e TC12 (Figura 7 b, f). A imunoreatividade de α -actina apresentou aumento significativo em relação ao grupo TC8 (Figura 9 a, f). A quantificação do nível proteico de IGFR1 não apresentou diferença significativa em relação ao TC8, bem como a imunomarcção estromal e epitelial em relação ao grupo TC8 (Figuras 9 b; 10 b, f, g).

Grupo TRAMP Controle 16 (TC16)

Com relação à densidade de máxima vascularização e média da densidade de microvaso, os animais controles com 16 semanas de idade não apresentaram diferenças significativas entre os grupos controles (TC8, TC12, TC16) (Figura 4 c, f, g). Diferenças na imunomarcacão de α -DG não foram verificadas (Figura 5 c, f), bem como para o nível proteico de β -DG a, quando considerado o controle endógeno de β -actina para cada grupo controle (Figura 6 a). Em relação ao nível proteico de laminina 1, verificou-se diminuição significativa quando comparado ao grupo TC8. No entanto, aumento da imunoreatividade laminina 5 foi observado (Figura 7 c, f). A imunomarcacão e quantificacão proteica de α -actina mostrou aumento significativo no grupo TC16 ao ser comparado com os demais grupos controles TC8 e TC12 (figuras 8 c, f; 9 a). Quanto à molécula de IGFR1, diferença significativa do nível proteico foi identificada em relação ao grupo TC8. (Figura 9 b). O IGFR1 apresentou tendência de aumento em relação ao grupo TC12, apesar dessa diferença não ser estatisticamente significativa (figura 10 c, f, g.).

Grupo TRAMP Nintedanibe 12 (TN12)

A densidade de máxima de vascularização foi significativamente menor no grupo TN12 em relação ao grupo controle TC12 (Figura 4 b, d, f). No entanto, a média de densidade de microvasos não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 4 g). A imunomarcacão de α -DG no grupo TN12 apresentou aumento significativo em relação ao grupo TC12 (Figura 5 d, f). Já a quantificacão proteica de β -DG não diferiu entre os grupos TN12 e TC12 (Figura 6 a). No que se refere à quantificacão proteica de laminina 1 e imunomarcacão de laminina 5, diferenças significativas não foram verificadas entre o grupo TN12 e o controle TC12 (Figuras 6 b; 7 d, f). Ainda, a imunomarcacão e nível proteico de α -actina e IGFR1 não apresentaram diferenças significativas com o tratamento de nintedanibe dos animais de 12 semanas, quando comparado ao grupo controle TC12 (Figuras 8 e, f; 9 a, b; 10 d, f, g).

Grupo TRAMP Nintedanibe 16 (TN16)

As densidades de máxima vascularização e média de microvasos no lobo dorsolateral dos camundongos tratados com Nintedanibe (TN16) não diferiram significativamente em comparação ao grupo controle TC16 (Figura 4 e, f, g). O tratamento com nintedanibe apresentou aumento significativo de imunoreatividade de α -DG (Figura 5 e, f), bem como do nível proteico de β -DG (6 a). Quanto à laminina 1, o nível proteico dessa molécula apresentou aumento significativo em relação ao grupo TC16 (Figura 6 b). No entanto, diminuição significativa da imunoreatividade de laminina 5 foi observada, em relação ao grupo TC16 (Figura 7 e, f). Em relação à α -actina, diferenças significativas em suas imunoreatividades e níveis proteicos não foram observadas (Figuras 8 d, 9). Diferenças significativas da imunoreatividade de IGFR1 não foram verificadas entre os grupos experimentais, embora possa ser observada tendência de diminuição após o tratamento com nintedanibe nos animais com 16 semanas de idade. Já a diminuição do nível proteico dessa molécula foi significativa em relação ao grupo TC16 (Figuras 9 b, 10 e, f, g).

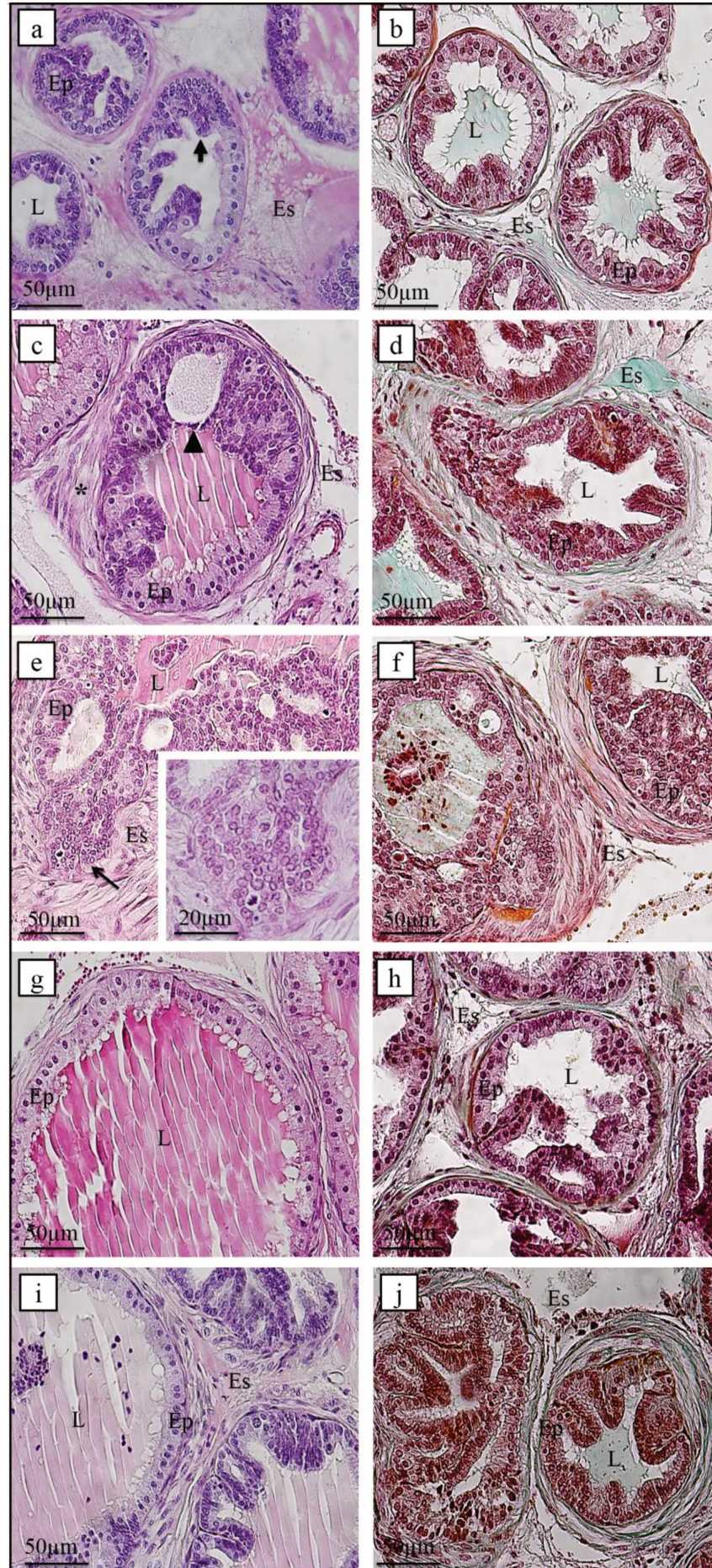


Figura 2: Fotomicrografia do LDL da próstata dos diferentes grupos experimentais. (a) Grupo TC8 (a,b): Ácinos com pregueamento da mucosa e epitélio secretor com variação de células cúbicas e colunares. Presença de NIP de baixo grau (seta grossa). Estroma composto por células musculares lisas entremeadas com componentes fibrilares ao redor dos ácinos. Grupo TC12 (c,d): Epitélio predominante colunar com núcleos basais. Presença de NIP de alto grau com padrão cribriforme (ponta de seta). Presença de hipertrofia, hiperplasia e espessamento dos elementos fibrilares (asterisco). Grupo TC16 (e,f): Epitélio semelhante ao grupo TC12, presença de adenocarcinoma bem diferenciado (seta fina). Grupo TN12 (g,h): Maior frequência de ácinos sem lesão quando comparado ao grupo TC12. Componentes estromais mais delgados sem a caracterização de hiperplasia. Grupo TN16 (i,j): Epitélio sem lesão frequente, além de diminuição da ocorrência de adenocarcinoma bem diferenciado. Ep: epitélio; Es: estroma; L: lúmen. Hematoxilina e Eosina (a,c,e,g,i), Tricrômico de Masson (b,d,f,h,j).

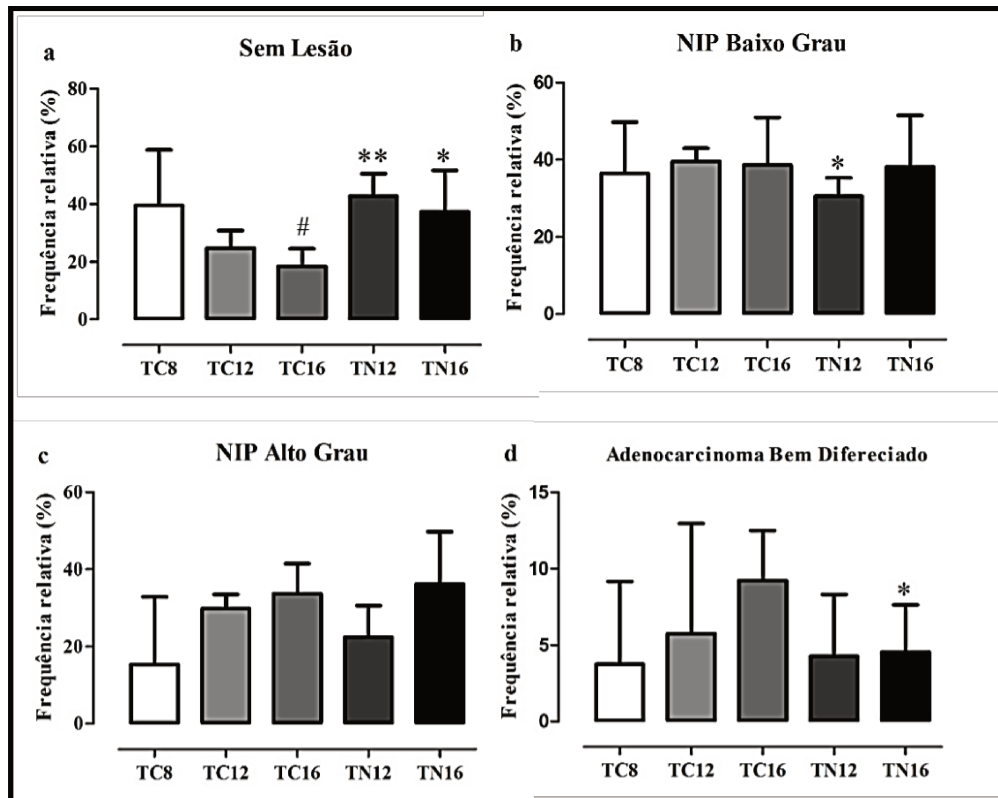


Figura 3: Frequência relativa dos ácinos sem ou com os diferentes padrões de lesões. (a) Frequência relativa de área sem lesão, onde: # representa $p < 0,05$ entre os grupos TC8 e TC16 ANOVA seguida de Tukey; (**) representa $p < 0,01$ entre TC12 e TN12 e (*) representa $p < 0,05$ entre TC16 e TN16, Teste T-Student (b) Frequência relativa de NIP de baixo grau, onde: (*) representa $p < 0,05$ entre TC12 e TN12, Teste T-Student. (c) Frequência relativa de NIP de alto grau. (d) Frequência relativa de adenocarcinoma bem diferenciado, onde: (*) representa $p < 0,05$ entre TC16 e TN16 Teste T-Student.

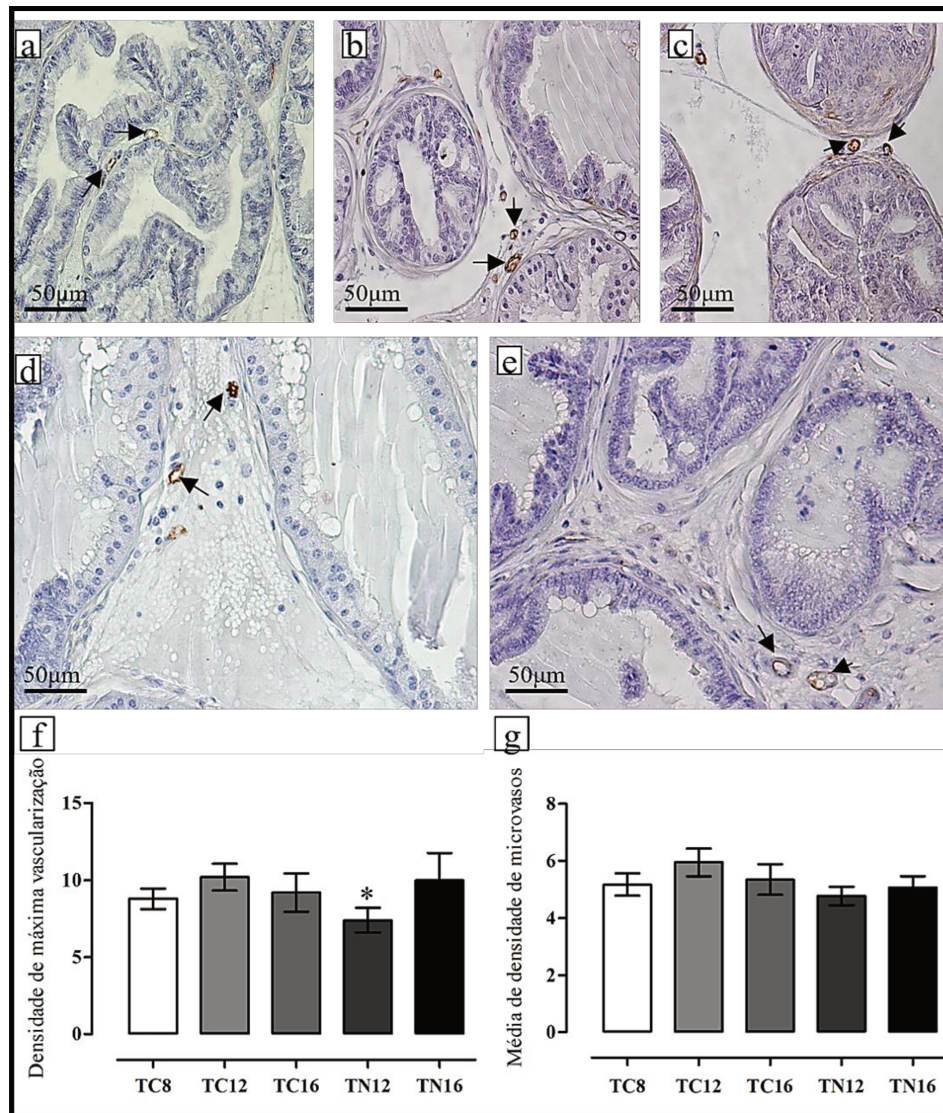


Figura 4: Imunomarcacão positiva para CD31 indicada por setas, (a) Grupo TC8; (b) Grupo TC12; (c) TC16; (d) Grupo TN12; (e) Grupo TN16; (f) Densidade de máxima vascularização, onde (*) representa $p < 0,05$ entre TC12 e TN12, Teste T-Student; (g) Média da densidade de microvasos.

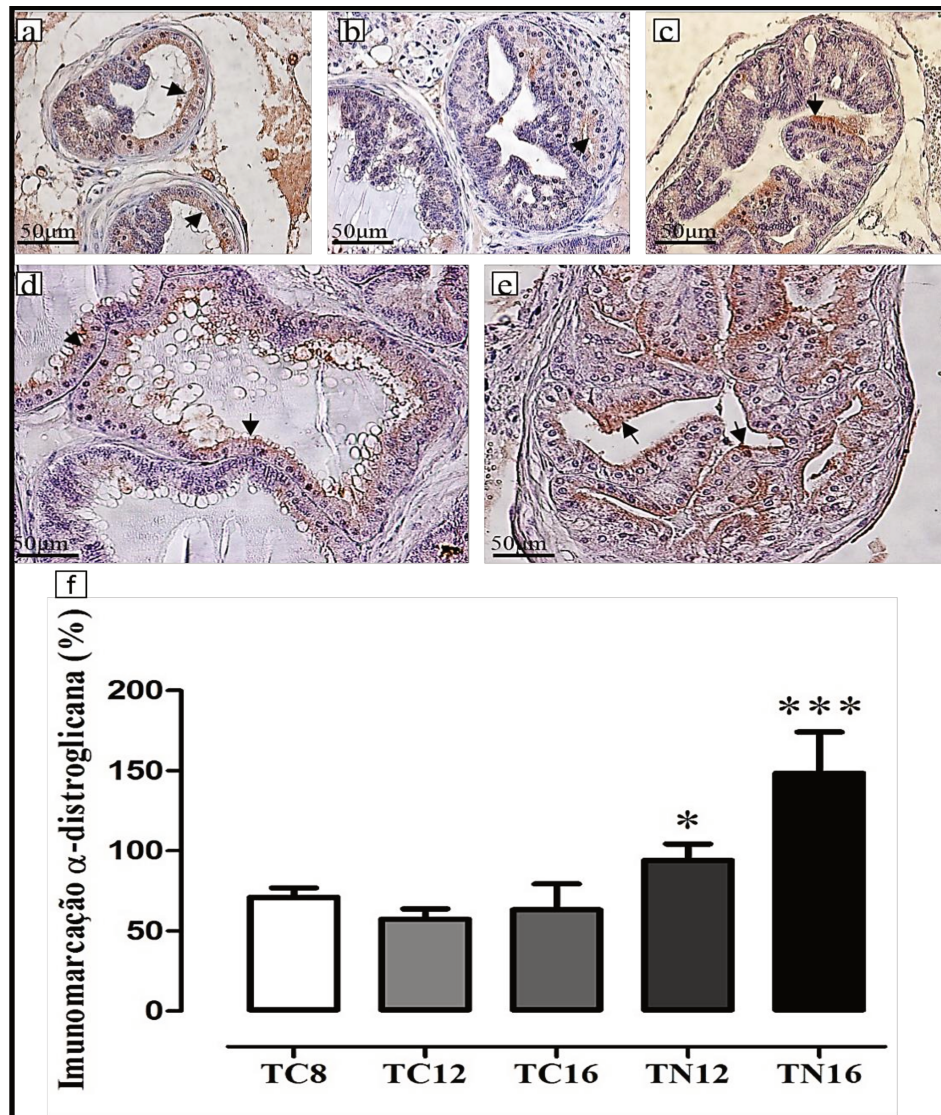


Figura 5: Imunomarcação positiva para α -dístroglicana indicada por setas nos grupos experimentais. (a) Grupo TC8; (b) Grupo TC12; (c) Grupo TC16; (d) Grupo TN12; (e) Grupo TN16; (f) Porcentagem da imunomarcação positiva da α -dístroglicana, onde (*) representa $p < 0,05$ entre TC12 e TN12 e (***) representa $p < 0,001$ entre TC16 e TN16, Teste T-Student.

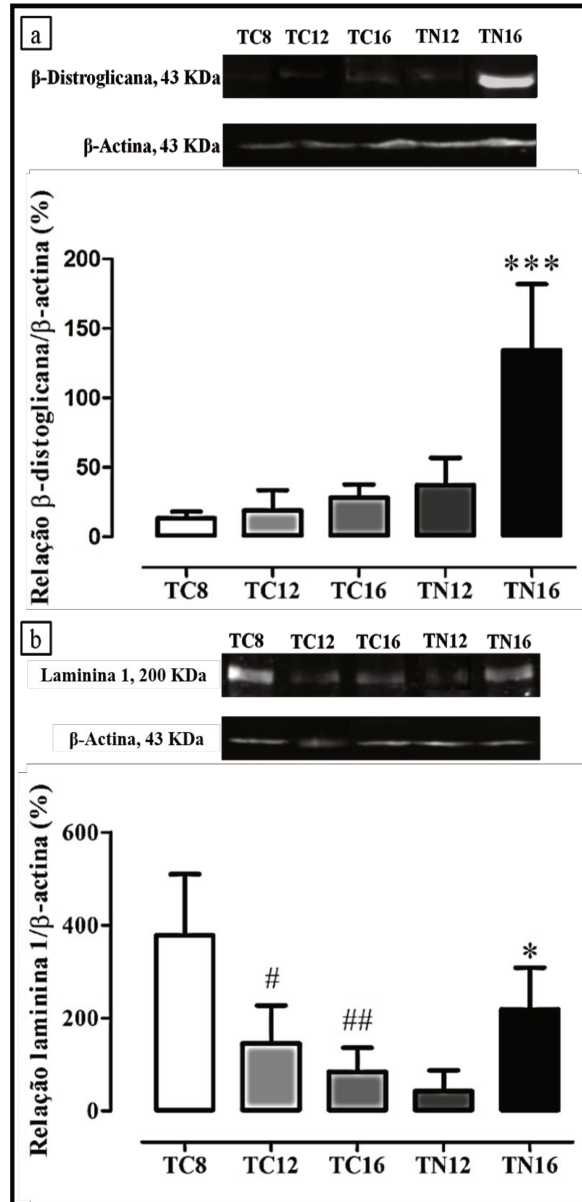


Figura 6: Análise dos níveis proteicos por *Western Blotting* de β-distroglicana (a), onde (***) representa $p < 0,001$ Teste T-Student, entre TC16 e TN16 e Laminina 10 (b), onde (#) representa $p < 0,05$ entre TC8 e TC12 e (##) representa $p < 0,01$ entre TC8 e TC16, ANOVA seguida de Tukey. (*) representa $p < 0,05$ entre TC16 e TN16, Teste T-Student. Dados demonstrados em média percentual $\pm$ desvio padrão em relação ao controle endógeno β-Actina.

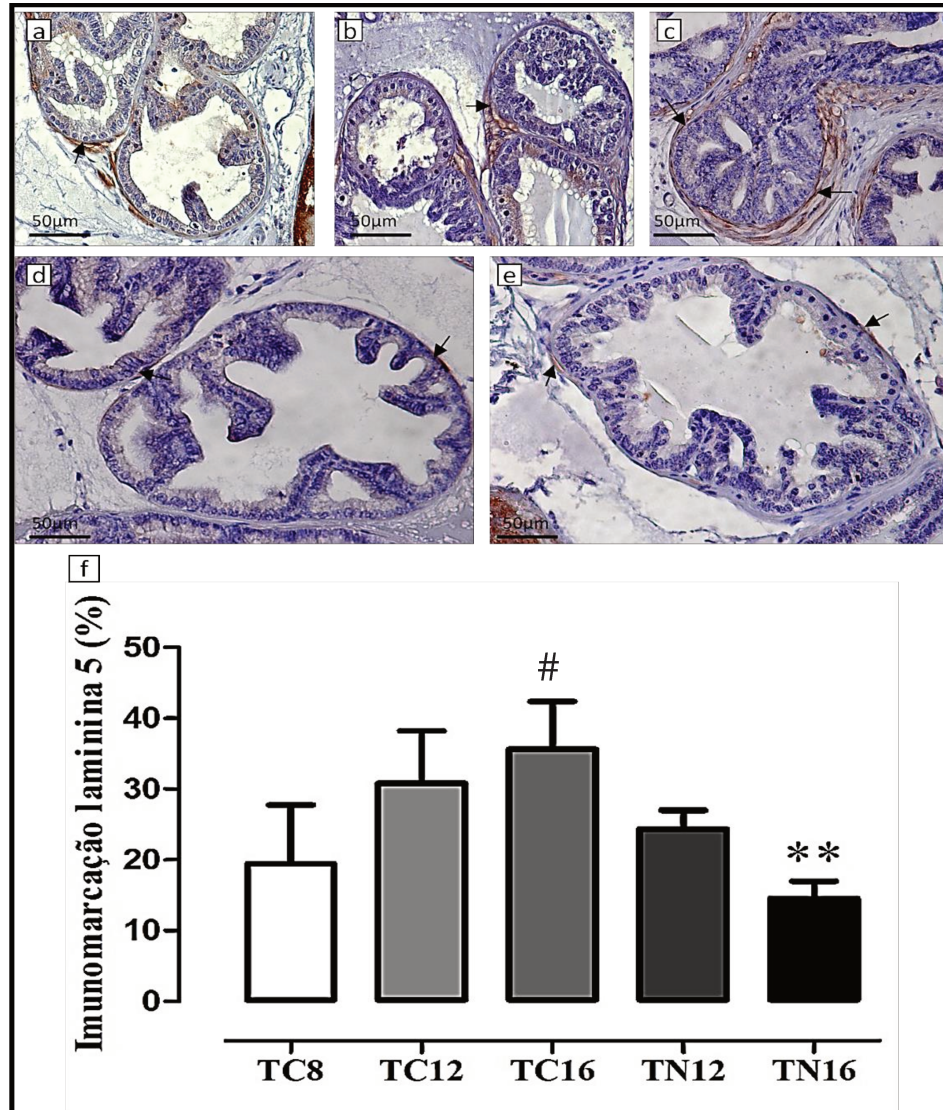


Figura 7: Imunomarcção positiva para laminina 5, indicada por setas. (a) Grupo TC8; (b) Grupo TC12; (c) Grupo TC16; (d) Grupo TN12; (e) Grupo TN16; (f) Porcentagem da imunomarcção positiva de laminina 5 ($\alpha 3$), onde (#) representa $p < 0,05$ entre TC8 e TC16, ANOVA seguida de Tukey e (**) representa $p < 0,01$ entre TC16 e TN16, Teste T-Student.

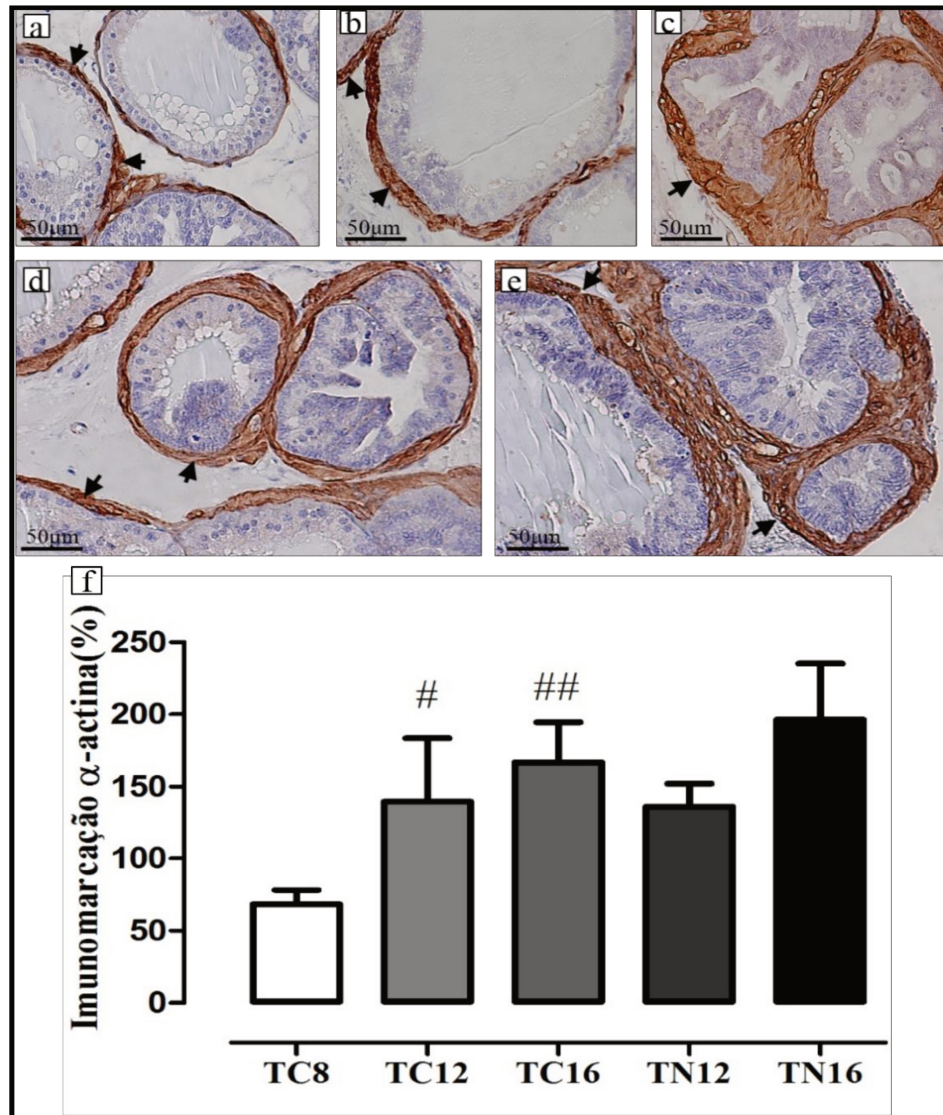


Figura 8: Imunomarcção positiva para α -actina, indicada por setas. (a) Grupo TC8; (b) Grupo TC12; (c) Grupo TC16; (d) Grupo TN12; (e) Grupo TN16; (f) Porcentagem da imunomarcção positiva de α -actina, onde (#) representa $p < 0,05$ entre TC8 e TC12 e (##) representa $p < 0,01$ entre TC8 e TC16, ANOVA seguida de Tukey.

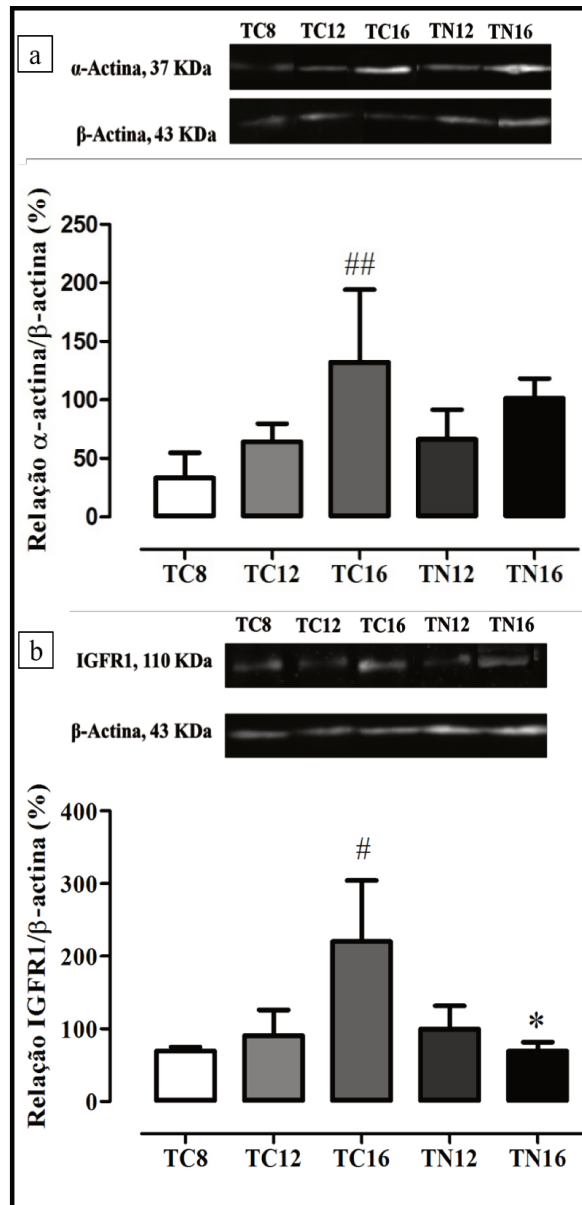


Figura 9: Análise dos níveis proteicos por *Western Blotting* de α -actina (a), onde (#) representa $p < 0,05$ ANOVA seguida de Tukey entre TC8 e TC16 e IGFR1 (b), onde (##) representa $p < 0,01$ ANOVA seguida de Tukey entre TC8 e TC16 e (*) representa $p < 0,05$ Teste T-Student entre TC16 e TN16. Dados demonstrados em média percentual $\pm$ desvio padrão em relação ao controle endógeno β -Actina.

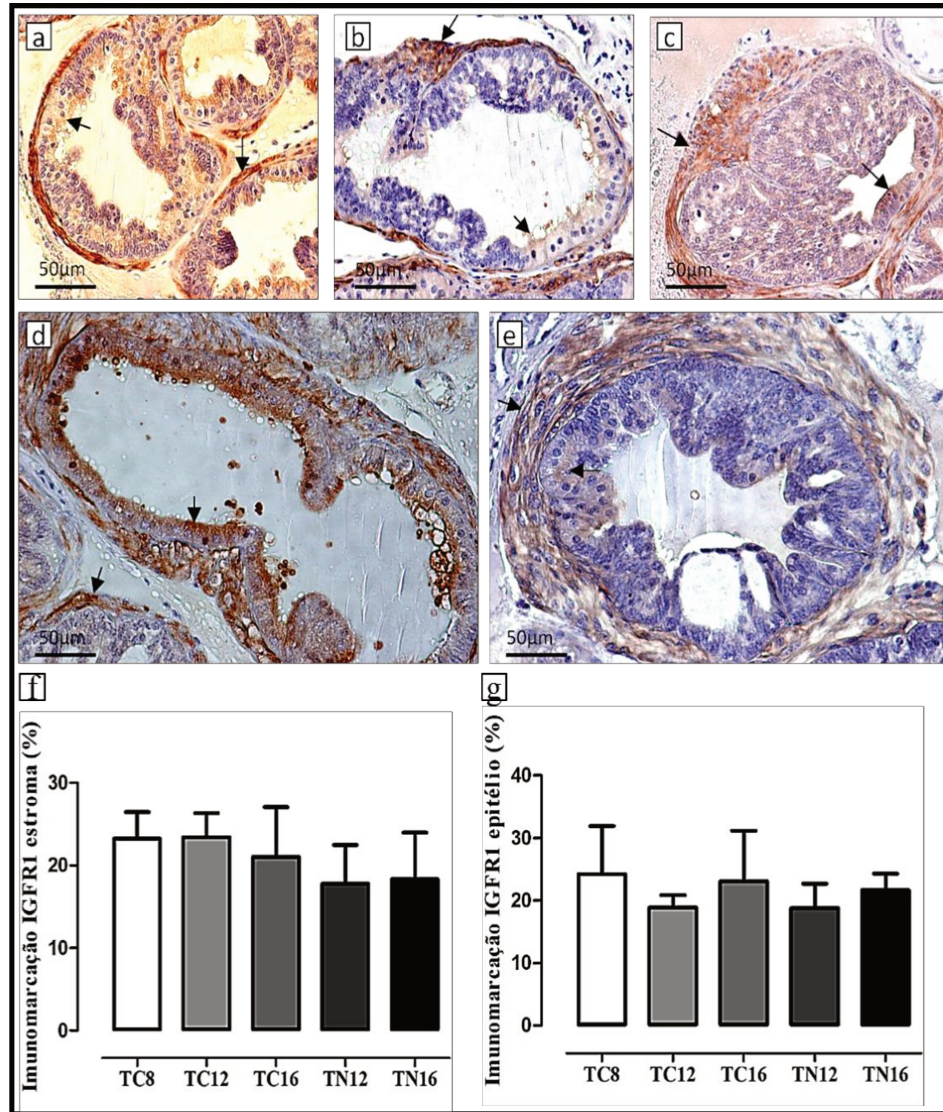


Figura 10: Imunomarcacão positiva para IGFR1 indicada por setas. (a) Grupo TC8; (b) Grupo TC12; (c) Grupo TC16; (d) Grupo TN12; (e) Grupo TN16; (f) Porcentagem da imunomarcacão positiva de IGFR1 no estroma; (g) Porcentagem da imunomarcacão positiva de IGFR1 no epitélio.

6.5 Discussão

Os resultados do presente estudo demonstraram a ação do nintedanibe no atraso da progressão do CaP através da restauração de importantes marcadores estruturais. Além disso, os resultados indicaram a importância da angiogênese para as alterações estruturais prostáticas durante a progressão das lesões neoplásicas. Assim, o tratamento com o nintedanibe promoveu o atraso do desenvolvimento das alterações estromais e da angiogênese, no grupo TN12, apesar da molécula de α -actina não ter respondido a nenhum dos períodos de tratamento. No grupo TN16, também se verificou atraso no desenvolvimento das neoplasias, embora não tão expressivo como no grupo TN12. Contudo, diminuição de adenocarcinoma bem diferenciado e do receptor de IGF (IGFR1) foi identificado no grupo TN16.

Ainda, nossos achados mostraram progressiva diminuição das áreas sem lesão, simultâneo ao aumento progressivo de adenocarcinoma bem diferenciado entre as idades de 8, 12 e 16 semanas nos camundongos TRAMP sem tratamento. Também, o LDL da próstata desses camundongos apresentou hipertrofia estromal. Esses resultados indicaram resposta estrutural do estroma ao microambiente glandular com predisposição para o desenvolvimento de lesões malignas.

Segundo a literatura, as interações entre epitélio e estroma são cruciais para a resposta da próstata aos hormônios androgênicos, que por sua vez são determinantes para os processos do desenvolvimento de lesões e fisiologia normal desse órgão (Hayward and Cunha 2000). No CaP, é conhecido que há aumento de componentes estromais, como fibras colágenas e fibroblastos, apontando que este compartimento está alterado nessa doença (Zhang et al. 2003). Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa foi verificado na próstata de camundongos FVB, durante o período da senescência, a ocorrência de desorganização estrutural e desequilíbrio hormonal. Essas alterações caracterizaram-se pela diminuição de testosterona, presença de hipertrofia estromal e infiltrado de células inflamatórias e foram observadas de forma semelhante no modelo TRAMP (Kido et al. 2014; Kido et al. 2016; Montico et al. 2011; Montico et al. 2015).

Ainda, a literatura tem evidenciado que no LDL de camundongos TRAMP, a lesão predominante nas idades de 8 e 12 semanas é a NIP e com 16 semanas o adenocarcinoma bem diferenciado é mais frequente (Kaplan-Lefko et al. 2003). Dessa forma, o TRAMP tem sido indicado como um bom modelo experimental para a avaliação de

fármacos que atuem na prevenção da NIP e neoplasias agressivas (Berman-Booty et al. 2012).

Com relação a α -actina, estudos demonstraram que essa molécula está aumentada na próstata do modelo TRAMP e que células musculares lisas estão envolvidas na sinalização do processo proliferativo de células epiteliais prostáticas, sugerindo que essas células podem participar ativamente das mudanças que ocorrem na remodelação estromal durante o CaP (Montico et al. 2015; Yu et al. 2011). Esses achados corroboram com nossos resultados, visto que a α -actina aumentou progressivamente com o avanço da idade no modelo TRAMP. Ainda, segundo Tuxhorn e colaboradores, durante o desenvolvimento do CaP, o compartimento estromal pode ser remodelado como parte de uma resposta adaptativa a um novo microambiente glandular com a presença da lesão (Tuxhorn et al 2001).

De acordo com a literatura, um dos mecanismos pelo qual as células estromais afetam a incidência da tumorigênese é a estimulação da angiogênese precoce (Tuxhorn et al. 2002b). Segundo Montico e colaboradores, a expressão do VEGF e do fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2), além da densidade de microvasos estão aumentados na próstata de camundongos TRAMP (Montico et al. 2015). Ainda, o bloqueio de VEGF nesse modelo a partir de 16 semanas de idade, promoveu apoptose das células dos vasos sanguíneos concomitante à redução da densidade desses, em tumores indiferenciados (Huss et al. 2003).

Considerando a importância dos FGF e dos seus receptores no processo da angiogênese e progressão do CaP, pesquisas têm sido desenvolvidas sobre a utilização de bloqueadores dos receptores de FGF (Brooks et al. 2012). O nintedanibe é um desses bloqueadores, o qual foi evidenciado como um agente inibidor de VEGFR, PDGFR e FGFR com o potencial de inibição de sinalizações pró-angiogênicas em células vasculares endoteliais e na diminuição da produção de matriz extracelular (Hilberg et al. 2008; Wollin et al. 2014).

Sabe-se que mudanças na expressão de FGFs e/ou de seus receptores (FGFR) estão envolvidas na progressão do CaP, incluindo a instalação da doença andrógeno-independente. Além disso, andrógenos podem atuar em células estromais da próstata aumentando a transcrição de VEGF e promovendo assim a proliferação de células endoteliais (Levine et al. 1998; Wang et al. 2013). Desse modo, as células endoteliais atuam não somente como fonte de suprimento de nutrientes e oxigênio para o crescimento tumoral, mas também aumentando o potencial metastático e contribuindo com a intensa habilidade de proliferação das células epiteliais (Wu et al. 2007; Zhu and Kyprianou 2008).

Freeman e colaboradores mostraram que camundongos induzidos à expressão ectópica de FGFR1, apresentaram NIP de baixo grau nos lobos ventral e dorsolateral da próstata, enquanto que aqueles que receberam indução ectópica para FGFR2 não apresentaram mudanças fenotípicas frequentes nesses mesmos lobos (Freeman et al. 2003). Os mesmos autores ainda reportaram que mesmo com a detecção de FGFR2 em ambos os grupos, este não foi suficiente para promover mudanças fenotípicas antes de 12 semanas de idade (Freeman et al. 2003). De outra forma, Konno-Takahashi e colaboradores observaram que no modelo de camundongo transgênico para expressão de FGF-2, a maioria das glândulas do LD apresentaram hiperplasia e aumento da proliferação epitelial, após 22 semanas de idade, em comparação aos camundongos sem a transgene (Konno-Takahashi et al. 2004).

Com relação ao FGF, foi demonstrado que a inativação dos alelos de FGF2 promoveu a inibição da progressão do câncer para um fenótipo de tumor indiferenciado e metastático Polnaszek et al. 2003. Em uma outra abordagem, Seghezzi e colaboradores verificaram que o FGF-2 tem efeito autócrino na modulação da expressão de VEGF pelas células endoteliais, induzindo, dessa maneira, a angiogênese (Polnaszek et al. 2003; Seghezzi et al. 1998). Em adição, Feng e colaboradores utilizaram AZ8010, um competidor e inibidor de FGFR, e demonstraram que a inibição de FGFR promoveu efeito significativo na diminuição da habilidade invasiva do que proliferativa em células do CaP (Feng et al. 2012).

Ainda, Huss e colaboradores, avaliando o processo de angiogênese no TRAMP, verificaram que nos eventos iniciais desse processo ocorre a expressão de HIF-1 α , um indicador de resposta a hipóxia, precedendo a expressão de VEGF. A partir desses resultados, os autores propuseram a ocorrência de dois momentos diferentes do processo denominado *switch* angiogênico (Huss et al. 2001). Assim, primeiramente durante o desenvolvimento da NIP, verifica-se a migração de vasos sanguíneos para próximo dos ductos prostáticos e o início da expressão de VEGF. A seguir, com a progressão do *switch* angiogênico, esses autores observaram mudanças na expressão dos receptores de VEGF, sendo que a expressão de VEGFR2, receptor relacionado à proliferação endotelial e sinalizações anti-apoptóticas, foi concomitante a perda da expressão do receptor VEGFR1, o qual está associado a migração endotelial, no adenocarcinoma indiferenciado (Huss et al. 2001).

No que se refere ao IGFR1, estudos relataram maior ocorrência desse receptor nas áreas de estroma prostático adjacente a células epiteliais tumorais, além de sua expressão aumentar no LV do camundongo TRAMP com o avançar da idade (Kido et al. 2016; Ryan et al. 2007). Diferentes estudos indicaram que essa maior incidência de IGFR1 em áreas

tumorais está relacionada ao aumento dos níveis de transcrição gênica, visto que a sinalização de IGF1 promove proliferação epitelial na próstata (Hellawell et al. 2002; Yu et al. 2011).

A partir de nossos resultados, verificamos que o nintedanibe levou ao atraso da progressão do CaP de forma marcante nos camundongos com 12 semanas de idade, correlacionando isso à diminuição dos pontos de máxima vascularização, os quais estão associados às lesões glandulares prostáticas no início do processo de *switch* angiogênico. O tratamento reduziu a incidência de adenocarcinoma bem diferenciado da próstata em camundongos com 16 semanas, logo, sendo efetivo na diminuição da severidade do CaP.

Além disso, podemos hipotizar que os diferentes efeitos do nintedanibe, considerando as idades dos animais avaliados, podem ser relacionados às mudanças de expressão dos receptores alvos dessa droga, bem como de suas sinalizações estromais e epiteliais, no processo de progressão do *switch* angiogênico.

Ainda, sugerimos que a resposta inalterada da α -actina ao tratamento com nintedanibe pode indicar o não envolvimento direto dessa molécula para o reestabelecimento estromal nos estágios iniciais da progressão do CaP, conforme observado no grupo TN12. Além disso, a diminuição de IGFR1 com a administração do Nintedanibe no grupo TN16 reforçou seu envolvimento no processo mitogênico da carcinogênese prostática, caracterizado pela diminuição de adenocarcinoma bem diferenciado identificado nesse grupo.

Com relação a distroglicana (DG), o tratamento com nintedanibe mostrou aumento significativo das subunidades α e β DG, particularmente, nos camundongos com 16 semanas de idade (TN16). Além disso, nossos resultados demonstraram diminuição estatisticamente significativa e progressiva da laminina 1 ($\alpha 1$) nos diferentes grupos experimentais sem tratamento, em oposição ao aumento dessa molécula no grupo tratado com nintedanibe (TN16). Por outro lado, aumento da laminina 5 ($\alpha 3$) foi identificado com a progressão inicial do CaP e diminuição com o tratamento com nintedanibe na idade de 16 semanas.

Estudos tem demonstrado a diminuição da DG em diferentes tipos de câncer, entre eles o de mama, glioma, coloretal e próstata (Cross et al. 2008; Henry et al. 2001; Zhang et al. 2014). Com relação ao glioma, os autores indicaram que essa diminuição pode estar relacionada com a agressividade tumoral (Zhang et al. 2014).

Na literatura especializada ainda não está claro qual é o mecanismo celular e ou molecular determinante na diminuição do complexo DG no processo de carcinogênese. Estudos demonstraram que a DG está diminuída na senescência e que esse complexo foi restaurado através da terapia hormonal (Montico et al. 2011). Ainda, Sgambato e

colaboradores sugeriram que a perda de α -DG é um evento inicial do processo de tumorigênese prostática (Sgambato et al. 2007). Nesse contexto, Esser e colaboradores avaliaram a morfologia, a ultraestrutura e a composição celular da próstata de camundongos sem expressão de DG, reportando que a falta dessa molécula não interferiu na manutenção da membrana basal da próstata e que a perda desse complexo é insuficiente para iniciar a progressão neoplásica na próstata. No entanto, os autores sugeriram que a perda da função das DG pode contribuir para a progressão tumoral, quando combinada com outras alterações moleculares ou celulares (Esser et al. 2010).

Outros autores, através da análise de diferentes linhagens celulares do CaP, verificaram que a expressão do mRNA de DG na linhagem DU145, foi maior do que a das demais linhagens analisadas, o que sugeriu que existem múltiplos mecanismos reguladores da expressão das subunidades de DG tanto em nível transcricional quanto pós-transcricional (Sgambato et al. 2007). Todavia, estudos indicaram que há possíveis mecanismos pós-traducionais, como clivagem por enzimas proteolíticas, que podem modular a expressão das DG bem como sua ligação com a lâmina basal no câncer (Bao et al. 2009; Leocadio et al. 2016).

Além disso, Yamada e colaboradores destacaram que as metaloproteínases (MMP) clivam o complexo DG, o que sugere a utilização da atividade das MMP, por células de carcinoma, para os processos metastáticos e invasão tumoral, visto que o complexo distroglicana deve ser rompido, quando ocorre remodelação tecidual (Yamada et al. 2001).

Sabe-se que a ligação entre moléculas estruturais como a laminina e o complexo DG, está envolvida com vias de sinalização celulares, e que a redução de fatores que promovem essa ligação leva ao aumento da migração de células cancerígenas e da formação tumoral (Bao et al. 2009; Lu et al. 2012).

De acordo com Bello-DeOcampo e colaboradores, a laminina 1 é essencial para a morfogênese dos ácinos da próstata e sua ligação com a integrina $\alpha 6 \beta 1$ é importante tanto para sua ligação com a membrana como para a polarização celular (Bello-DeOcampo et al. 2001).

Também, é conhecido que além de sua função estrutural, a laminina participa da ativação de vias de sinalização que podem contribuir para a disseminação tumoral dependendo de sua isoforma, conformação, além da expressão de seus diferentes receptores (Givant-Horwitz et al. 2004; Givant-Horwitz et al. 2005). Durante o processo de senescência, o início e progressão tumoral depende da expressão de lamininas, devido a sua participação nas alterações da membrana basal da próstata durante esse período de vida (Sprenger et al.

2010). Além disso, a diminuição da expressão da subunidade $\alpha 1$ da laminina foi reportada na membrana basal de carcinoma primário da próstata (Brar et al. 2003).

Estudos demonstraram que no microambiente tumoral, a sinalização de FGF e de seus receptores leva ao aumento da angiogênese através de ações parácrinas sobre células estromais, interagindo com a membrana basal através de heparan sulfato (Czubayko et al. 1997; Feng et al. 2012; Ornitz and Itoh 2015). Além disso, é conhecido que os FGF estão ligados à remodelação tecidual no microambiente tumoral (Lu et al. 2011; Miyake et al. 1997).

Por outro lado, em relação à laminina 5, Hao e colaboradores demonstraram que as subunidades β e γ não estão expressas no CaP, entretanto a subunidade α apresenta persistência na lamina basal e sua ocorrência é variável tanto no tecido normal como no do carcinoma invasivo prostático (Hao et al. 2001; Hao et al. 1996).

Champlaud e colaboradores indicaram que a subunidade $\alpha 3$ da laminina 5 pode se ligar as subunidades β e γ das lamininas 6 e 7, fazendo com que sua expressão persista na ausência das subunidades $\beta 3$ e $\gamma 2$ da laminina 5 (Champlaud et al. 1996). Ainda, o bloqueio da subunidade $\alpha 3$ é capaz de inibir a migração celular, sem interferir na adesão celular indicando o envolvimento dessa subunidade da laminina a processos importantes na tumorigênese (Giannelli and Antonaci 2000; Giannelli et al. 1997). Ainda, Tran e colaboradores estudaram o domínio proteico G45, que está contido na região precursora da subunidade $\alpha 3$ da laminina 5, verificando que esse domínio está aumentado em tumor de pele. Os mesmos autores ainda reportaram que é possível indicar que a produção de laminina 5, nesse tipo de câncer, pode exceder a habilidade enzimática sobre a remoção do domínio G45, resultando na persistência de laminina 5 não processada (Tran et al. 2008).

Assim, a partir dos resultados do presente estudo, evidenciamos que não há diminuição progressiva do complexo DG nos estágios iniciais do CaP. Ainda, o tratamento com nintedanibe proporcionou a restauração do complexo funcional DG e da laminina 1, os quais se mostraram indicadores de progressão tumoral no modelo camundongo TRAMP, visto que sua restauração está relacionada à diminuição de adenocarcinoma bem diferenciado.

Também, sugerimos que o mecanismo de bloqueio do nintedanibe sobre os receptores de FGF e VEGF, pode ter interferido na sinalização entre a MEC e os fatores de crescimento que levam a remodelação tecidual neoplásica, resultando na restauração das moléculas estruturais estudadas.

Com relação ao aumento da subunidade $\alpha 3$ da laminina 5 observado nos estágios iniciais da progressão do CaP, nossa hipótese é que sua ocorrência pode ser resultado do

processamento tecidual da laminina no remodelamento do microambiente pró-tumorigênico. Ainda, esse processo poderia ter sido revertido com o tratamento, culminando na diminuição de laminina 5 no grupo TN16 ($\alpha 3$). Desse modo, sugerimos que são necessários estudos que avaliem a expressão e modulação das isoformas da laminina 5 durante a progressão da tumorigênese prostática. Assim, o conhecimento de seu comportamento poderia fazê-lo um possível marcador da progressão do CaP, visto que difere de outras lamininas e isoformas.

Concluimos que a interferência do nintedanibe nas vias de sinalização dos fatores de crescimento via bloqueio de seus receptores, promoveram alterações positivas no atraso da proliferação que se refletiram tanto no epitélio quanto no estroma prostático durante os estágios iniciais da progressão do CaP. Portanto, o estudo dessas vias correlacionadas com os componentes estruturais, bem como seu comportamento nos diferentes estágios da progressão do câncer, é uma importante abordagem para o desenvolvimento de terapias efetivas contra o CaP.

6.6. Referências Bibliográficas

- Bao X et al. (2009) Tumor suppressor function of laminin-binding alpha-dystroglycan requires a distinct beta3-N-acetylglucosaminyltransferase *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12109-12114 doi:10.1073/pnas.0904515106
- Barresi R, Campbell KP (2006) Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease *J Cell Sci* 119:199-207 doi:10.1242/jcs.02814
- Barron DA, Rowley DR (2012) The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression *Endocr Relat Cancer* 19:R187-204 doi:10.1530/ERC-12-0085
- Bello-DeOcampo D, Kleinman HK, Deocampo ND, Webber MM (2001) Laminin-1 and alpha6beta1 integrin regulate acinar morphogenesis of normal and malignant human prostate epithelial cells *Prostate* 46:142-153
- Berman-Booty LD, Sargeant AM, Rosol TJ, Rengel RC, Clinton SK, Chen CS, Kulp SK (2012) A review of the existing grading schemes and a proposal for a modified grading scheme for prostatic lesions in TRAMP mice *Toxicol Pathol* 40:5-17 doi:10.1177/0192623311425062
- Bostwick DG, Brawer MK (1987) Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer *Cancer* 59:788-794
- Bousquet G et al. (2011) Phase I study of BIBF 1120 with docetaxel and prednisone in metastatic chemo-naïve hormone-refractory prostate cancer patients *British journal of cancer* 105:1640-1645 doi:10.1038/bjc.2011.440
- Brar PK, Dalkin BL, Weyer C, Sallam K, Virtanen I, Nagle RB (2003) Laminin alpha-1, alpha-3, and alpha-5 chain expression in human prepubertal [correction of prepubetal] benign prostate glands and adult benign and malignant prostate glands *Prostate* 55:65-70 doi:10.1002/pros.10206
- Brennan PA, Jing J, Ethunandan M, Górecki D (2004) Dystroglycan complex in cancer *Eur J Surg Oncol* 30:589-592 doi:10.1016/j.ejso.2004.03.014

- Brooks AN, Kilgour E, Smith PD (2012) Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer *Clin Cancer Res* 18:1855-1862 doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0699
- Capdevila J, Carrato A, Tabernero J, Grande E (2014) What could Nintedanib (BIBF 1120), a triple inhibitor of VEGFR, PDGFR, and FGFR, add to the current treatment options for patients with metastatic colorectal cancer? *Crit Rev Oncol Hematol* 92:83-106 doi:10.1016/j.critrevonc.2014.05.004
- Champliaud MF, Lunstrum GP, Rousselle P, Nishiyama T, Keene DR, Burgeson RE (1996) Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment *J Cell Biol* 132:1189-1198
- Chiaverotti T et al. (2008) Dissociation of epithelial and neuroendocrine carcinoma lineages in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model of prostate cancer *Am J Pathol* 172:236-246 doi:10.2353/ajpath.2008.070602
- Cohen P, Peehl DM, Lamson G, Rosenfeld RG (1991) Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins in primary cultures of prostate epithelial cells *J Clin Endocrinol Metab* 73:401-407 doi:10.1210/jcem-73-2-401
- Cross SS et al. (2008) Expression of beta-dystroglycan is reduced or absent in many human carcinomas *Histopathology* 53:561-566 doi:10.1111/j.1365-2559.2008.03157.x
- Czubayko F, Liaudet-Coopman ED, Aigner A, Tuveson AT, Berchem GJ, Wellstein A (1997) A secreted FGF-binding protein can serve as the angiogenic switch in human cancer *Nat Med* 3:1137-1140
- Dunn SE, Kari FW, French J, Leininger JR, Travlos G, Wilson R, Barrett JC (1997) Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice *Cancer Res* 57:4667-4672
- Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, Giwercman A (2002) The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility *Hum Reprod* 17:2904-2911
- Esser AK, Cohen MB, Henry MD (2010) Dystroglycan is not required for maintenance of the luminal epithelial basement membrane or cell polarity in the mouse prostate *Prostate* 70:777-787 doi:10.1002/pros.21110
- Feng S, Shao L, Yu W, Gavine P, Ittmann M (2012) Targeting fibroblast growth factor receptor signaling inhibits prostate cancer progression *Clin Cancer Res* 18:3880-3888 doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-3214
- Foster BA, Gingrich JR, Kwon ED, Madias C, Greenberg NM (1997) Characterization of prostatic epithelial cell lines derived from transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model *Cancer Res* 57:3325-3330
- Freeman KW, Welm BE, Gangula RD, Rosen JM, Ittmann M, Greenberg NM, Spencer DM (2003) Inducible prostate intraepithelial neoplasia with reversible hyperplasia in conditional FGFR1-expressing mice *Cancer Res* 63:8256-8263
- Giannelli G, Antonaci S (2000) Biological and clinical relevance of Laminin-5 in cancer *Clin Exp Metastasis* 18:439-443
- Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V (1997) Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5 *Science* 277:225-228
- Gingrich JR et al. (1996) Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse *Cancer Res* 56:4096-4102
- Giri D, Ropiquet F, Ittmann M (1999) Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer *Clin Cancer Res* 5:1063-1071

- Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R (2004) Laminin-induced signaling in tumor cells: the role of the M(r) 67,000 laminin receptor *Cancer Res* 64:3572-3579 doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3424
- Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R (2005) Laminin-induced signaling in tumor cells *Cancer Lett* 223:1-10 doi:10.1016/j.canlet.2004.08.030
- Greenberg NM et al. (1995) Prostate cancer in a transgenic mouse *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3439-3443
- Hao J, Jackson L, Calaluze R, McDaniel K, Dalkin BL, Nagle RB (2001) Investigation into the mechanism of the loss of laminin 5 (alpha3beta3gamma2) expression in prostate cancer *Am J Pathol* 158:1129-1135
- Hao J, Yang Y, McDaniel KM, Dalkin BL, Cress AE, Nagle RB (1996) Differential expression of laminin 5 (alpha 3 beta 3 gamma 2) by human malignant and normal prostate *Am J Pathol* 149:1341-1349
- Hayward SW, Cunha GR (2000) The prostate: development and physiology *Radiol Clin North Am* 38:1-14
- Hellawell GO, Turner GD, Davies DR, Poulson R, Brewster SF, Macaulay VM (2002) Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease *Cancer Res* 62:2942-2950
- Henry MD, Cohen MB, Campbell KP (2001) Reduced expression of dystroglycan in breast and prostate cancer *Hum Pathol* 32:791-795 doi:10.1053/hupa.2001.26468
- Hilberg F et al. (2008) BIBF 1120: triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy *Cancer Res* 68:4774-4782 doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6307
- Hochberg DA, Basillote JB, Armenakas NA, Vasovic L, Shevchuk M, Pareek G, Fracchia JA (2002) Decreased suburethral prostatic microvessel density in finasteride treated prostates: a possible mechanism for reduced bleeding in benign prostatic hyperplasia *The Journal of urology* 167:1731-1733
- Huang RY et al. (2015) Functional relevance of a six mesenchymal gene signature in epithelial-mesenchymal transition (EMT) reversal by the triple angiokinase inhibitor, nintedanib (BIBF1120) *Oncotarget* 6:22098-22113
- Huss WJ, Barrios RJ, Greenberg NM (2003) SU5416 selectively impairs angiogenesis to induce prostate cancer-specific apoptosis *Mol Cancer Ther* 2:611-616
- Huss WJ, Hanrahan CF, Barrios RJ, Simons JW, Greenberg NM (2001) Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch *Cancer Res* 61:2736-2743
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections *The Histochemical journal* 11:447-455
- Kaplan-Lefko PJ et al. (2003) Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model *Prostate* 55:219-237 doi:10.1002/pros.10215
- Kaplan PJ, Mohan S, Cohen P, Foster BA, Greenberg NM (1999) The insulin-like growth factor axis and prostate cancer: lessons from the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model *Cancer Res* 59:2203-2209
- Kido LA, Hetzl AC, Cândido EM, Montico F, Lorencini RM, Cagnon VH (2014) Antiangiogenic and finasteride therapies: responses of the prostate microenvironment in elderly mice *Life Sci* 106:58-70 doi:10.1016/j.lfs.2014.04.027
- Kido LA et al. (2016) Anti-inflammatory therapies in TRAMP mice: delay in prostate cancer progression *Endocr Relat Cancer* doi:10.1530/ERC-15-0540
- Kleinman HK, Weeks BS (1989) Laminin: structure, functions and receptors *Curr Opin Cell Biol* 1:964-967

- Konno-Takahashi N et al. (2004) Engineered FGF-2 expression induces glandular epithelial hyperplasia in the murine prostatic dorsal lobe *Eur Urol* 46:126-132 doi:10.1016/j.eururo.2004.02.004
- Krušlin B, Ulamec M, Tomas D (2015) Prostate cancer stroma: an important factor in cancer growth and progression *Bosn J Basic Med Sci* 15:1-8
- Kudo K et al. (2011) Antitumor activity of BIBF 1120, a triple angiokinase inhibitor, and use of VEGFR2+pTyr+ peripheral blood leukocytes as a pharmacodynamic biomarker in vivo *Clin Cancer Res* 17:1373-1381 doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2755
- Kutluk Cenik B, Ostapoff KT, Gerber DE, Brekken RA (2013) BIBF 1120 (nintedanib), a triple angiokinase inhibitor, induces hypoxia but not EMT and blocks progression of preclinical models of lung and pancreatic cancer *Mol Cancer Ther* 12:992-1001 doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0995
- Kwabi-Addo B, Ozen M, Ittmann M (2004) The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer *Endocr Relat Cancer* 11:709-724 doi:10.1677/erc.1.00535
- Leocadio D, Mitchell A, Winder SJ (2016) γ -Secretase Dependent Nuclear Targeting of Dystroglycan *J Cell Biochem* doi:10.1002/jcb.25537
- Levine AC et al. (1998) Androgens induce the expression of vascular endothelial growth factor in human fetal prostatic fibroblasts *Endocrinology* 139:4672-4678 doi:10.1210/endo.139.11.6303
- Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z (2011) Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3 doi:10.1101/cshperspect.a005058
- Lu P, Weaver VM, Werb Z (2012) The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression *J Cell Biol* 196:395-406 doi:10.1083/jcb.201102147
- Mandarim-de-Lacerda CA (1995) Métodos quantitativos em morfologia Rio de Janeiro
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR (2003) Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development *Dev Biol* 253:165-174
- Mitchell A, Mathew G, Jiang T, Hamdy FC, Cross SS, Eaton C, Winder SJ (2013) Dystroglycan function is a novel determinant of tumor growth and behavior in prostate cancer *Prostate* 73:398-408 doi:10.1002/pros.22581
- Miyake H, Yoshimura K, Hara I, Eto H, Arakawa S, Kamidono S (1997) Basic fibroblast growth factor regulates matrix metalloproteinases production and in vitro invasiveness in human bladder cancer cell lines *J Urol* 157:2351-2355
- Montico F, Hetzl AC, Cândido EM, Fávaro WJ, Cagnon VH (2011) Hormonal therapy in the senescence: Prostatic microenvironment structure and adhesion molecules *Micron* 42:642-655 doi:10.1016/j.micron.2011.03.004
- Montico F, Kido LA, Hetzl AC, Cagnon VH (2015) Prostatic angiogenic responses in late life: antiangiogenic therapy influences and relation with the glandular microenvironment in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model *The Prostate* 75:484-499 doi:10.1002/pros.22934
- Montico F, Kido LA, Hetzl AC, Lorencini RM, Cândido 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* 142:269-284 doi:10.1007/s00418-014-1193-2
- Muschler J, Levy D, Boudreau R, Henry M, Campbell K, Bissell MJ (2002) A role for dystroglycan in epithelial polarization: loss of function in breast tumor cells *Cancer Res* 62:7102-7109
- Niu YN, Xia SJ (2009) Stroma-epithelium crosstalk in prostate cancer *Asian J Androl* 11:28-35 doi:10.1038/aja.2008.39

- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR (1999) Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium *Cancer Res* 59:5002-5011
- Ornitz DM, Itoh N (2015) The Fibroblast Growth Factor signaling pathway Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 4:215-266 doi:10.1002/wdev.176
- Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I (2002) Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis *Semin Cancer Biol* 12:197-207 doi:10.1016/S1044-579X(02)00023-8
- Polnaszek N et al. (2003) Fibroblast growth factor 2 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer *Cancer Res* 63:5754-5760
- Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling *Endocr Relat Cancer* 7:165-197
- Rangarajan S et al. (2016) Novel Mechanisms for the Antifibrotic Action of Nintedanib *Am J Respir Cell Mol Biol* 54:51-59 doi:10.1165/rcmb.2014-0445OC
- Ryan CJ et al. (2007) Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in local and metastatic prostate cancer *Urol Oncol* 25:134-140 doi:10.1016/j.urolonc.2006.07.019
- Seghezzi G et al. (1998) Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis *J Cell Biol* 141:1659-1673
- Sgambato A et al. (2007) Dystroglycan expression is reduced during prostate tumorigenesis and is regulated by androgens in prostate cancer cells *J Cell Physiol* 213:528-539 doi:10.1002/jcp.21130
- Sprenger CC, Plymate SR, Reed MJ (2010) Aging-related alterations in the extracellular matrix modulate the microenvironment and influence tumor progression *Int J Cancer* 127:2739-2748 doi:10.1002/ijc.25615
- Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA (1986) Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate *Biol Reprod* 34:961-971
- Tran M, Rousselle P, Nokelainen P, Tallapragada S, Nguyen NT, Fincher EF, Marinkovich MP (2008) Targeting a tumor-specific laminin domain critical for human carcinogenesis *Cancer Res* 68:2885-2894 doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6160
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR (2002a) Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling *Clin Cancer Res* 8:2912-2923
- Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Yang F, Dang TD, Rowley DR (2002b) Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model *Cancer Res* 62:6021-6025
- Wang X et al. (2013) Endothelial cells enhance prostate cancer metastasis via IL-6→androgen receptor→TGF-β→MMP-9 signals *Mol Cancer Ther* 12:1026-1037 doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0895
- Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J (1993) Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma *Am J Pathol* 143:401-409
- Wollin L, Maillet I, Quesniaux V, Holweg A, Ryffel B (2014) Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis *J Pharmacol Exp Ther* 349:209-220 doi:10.1124/jpet.113.208223
- Wu CT et al. (2007) Increased prostate cell proliferation and loss of cell differentiation in mice lacking prostate epithelial androgen receptor *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12679-12684 doi:10.1073/pnas.0704940104

- Yamada H et al. (2001) Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex *Hum Mol Genet* 10:1563-1569
- Yu S et al. (2011) Altered prostate epithelial development and IGF-1 signal in mice lacking the androgen receptor in stromal smooth muscle cells *Prostate* 71:517-524 doi:10.1002/pros.21264
- Zar JH (1999) *Biostatistical Analysis*. New Jersey, USA
- Zhang X et al. (2014) Reduction of α -dystroglycan expression is correlated with poor prognosis in glioma *Tumour Biol* 35:11621-11629 doi:10.1007/s13277-014-2418-7
- Zhang Y, Nojima S, Nakayama H, Jin Y, Enza H (2003) Characteristics of normal stromal components and their correlation with cancer occurrence in human prostate *Oncol Rep* 10:207-211
- Zhu ML, Kyprianou N (2008) Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells *Endocr Relat Cancer* 15:841-849 doi:10.1677/ERC-08-0084

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barron DA, Rowley DR (2012) The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer* 19 (6):R187-204. doi:10.1530/ERC-12-0085
- Bostwick DG, Brawer MK (1987) Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer* 59 (4):788-794
- Brennan PA, Jing J, Ethunandan M, Górecki D (2004) Dystroglycan complex in cancer. *Eur J Surg Oncol* 30 (6):589-592. doi:10.1016/j.ejso.2004.03.014
- Dunn SE, Kari FW, French J, Leininger JR, Travlos G, Wilson R, Barrett JC (1997) Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice. *Cancer Res* 57 (21):4667-4672
- Cohen P, Peehl DM, Lamson G, Rosenfeld RG (1991) Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins in primary cultures of prostate epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 73 (2):401-407. doi:10.1210/jcem-73-2-401
- Ellem SJ, Risbridger GP (2010) Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 118 (4-5):246-251. doi:10.1016/j.jsbmb.2009.10.015
- Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, Giwercman A (2002) The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod* 17 (11):2904-2911
- Gingrich JR, Barrios RJ, Morton RA, Boyce BF, DeMayo FJ, Finegold MJ, Angelopoulou R, Rosen JM, Greenberg NM (1996) Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer Res* 56 (18):4096-4102
- Giri D, Ropiquet F, Ittmann M (1999) Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 5 (5):1063-1071
- Hetzel AC, Montico F, Lorencini RM, Kido LA, Cândido EM, Cagnon VH (2014) Prostatic microenvironment in senescence: fibroblastic growth factors × hormonal imbalance. *Histochem Cell Biol* 141 (5):531-542. doi:10.1007/s00418-013-1173-y
- Hilberg F, Roth GJ, Krssak M, Kautschitsch S, Sommergruber W, Tontsch-Grunt U, Garin-Chesa P, Bader G, Zoephel A, Quant J, Heckel A, Rettig WJ (2008) BIBF 1120: triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Res* 68 (12):4774-4782. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6307
- Hsing AW (2001) Hormones and prostate cancer: what's next? *Epidemiol Rev* 23 (1):42-58
- Huss WJ, Hanrahan CF, Barrios RJ, Simons JW, Greenberg NM (2001) Angiogenesis and prostate cancer
- INCA, 2016 disponível em
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/definicao>
- Krušlin B, Ulapec M, Tomas D (2015) Prostate cancer stroma: an important factor in cancer growth and progression. *Bosn J Basic Med Sci* 15 (2):1-8
- Kudo K, Arao T, Tanaka K, Nagai T, Furuta K, Sakai K, Kaneda H, Matsumoto K, Tamura D, Aomatsu K, De Velasco MA, Fujita Y, Saijo N, Kudo M, Nishio K (2011) Antitumor activity of BIBF 1120, a triple angiokinase inhibitor, and use of VEGFR2+pTyr+ peripheral blood leukocytes as a pharmacodynamic biomarker in vivo. *Clin Cancer Res* 17 (6):1373-1381. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2755
- Kurita T, Wang YZ, Donjacour AA, Zhao C, Lydon JP, O'Malley BW, Isaacs JT, Dahiya R, Cunha GR (2001) Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male

- and female reproductive system. *Cell Death Differ* 8 (2):192-200. doi:10.1038/sj.cdd.4400797
- Kutluk Cenik B, Ostapoff KT, Gerber DE, Brekken RA (2013) BIBF 1120 (nintedanib), a triple angiokinase inhibitor, induces hypoxia but not EMT and blocks progression of preclinical models of lung and pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 12 (6):992-1001. doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0995
- Kwabi-Addo B, Ozen M, Ittmann M (2004) The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 11 (4):709-724. doi:10.1677/erc.1.00535
- Lau KM, LaSpina M, Long J, Ho SM (2000) Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation. *Cancer Res* 60 (12):3175-3182
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR (2003) Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol* 253 (2):165-174
- Mitchell A, Mathew G, Jiang T, Hamdy FC, Cross SS, Eaton C, Winder SJ (2013) Dystroglycan function is a novel determinant of tumor growth and behavior in prostate cancer. *Prostate* 73 (4):398-408. doi:10.1002/pros.22581
- Montico F, Hetzl AC, Cândido EM, Fávoro WJ, Cagnon VH (2011) Hormonal therapy in the senescence: Prostatic microenvironment structure and adhesion molecules. *Micron* 42 (6):642-655. doi:10.1016/j.micron.2011.03.004
- Montico F, Kido LA, Hetzl AC, Lorencini RM, Cândido 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* 142 (3):269-284. doi:10.1007/s00418-014-1193-2
- Montico F, Kido LA, Hetzl AC, Cagnon VH (2015a) Prostatic angiogenic responses in late life: antiangiogenic therapy influences and relation with the glandular microenvironment in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model. *Prostate* 75 (5):484-499. doi:10.1002/pros.22934
- Montico F, Kido LA, San Martin R, Rowley DR, Cagnon VH (2015b) Reactive stroma in the prostate during late life: The role of microvasculature and antiangiogenic therapy influences. *Prostate* 75 (14):1643-1661. doi:10.1002/pros.23045
- Niu YN, Xia SJ (2009) Stroma-epithelium crosstalk in prostate cancer. *Asian J Androl* 11 (1):28-35. doi:10.1038/aja.2008.39
- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR (1999) Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 59 (19):5002-5011
- Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7 (3):165-197
- Ryan CJ, Haqq CM, Simko J, Nonaka DF, Chan JM, Weinberg V, Small EJ, Goldfine ID (2007) Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in local and metastatic prostate cancer. *Urol Oncol* 25 (2):134-140. doi:10.1016/j.urolonc.2006.07.019
- Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA (1986) Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod* 34 (5):961-971
- Tindall DJ, Rittmaster RS (2008) The rationale for inhibiting 5alpha-reductase isoenzymes in the prevention and treatment of prostate cancer. *J Urol* 179 (4):1235-1242. doi:10.1016/j.juro.2007.11.033
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65 (2):87-108. doi:10.3322/caac.21262

- Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR (2002) Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res* 8 (9):2912-2923
- Yurchenco PD (2011) Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3 (2). doi:10.1101/cshperspect.a004911
- Zhu ML, Kyprianou N (2008) Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 15 (4):841-849. doi:10.1677/ERC-08-0084

8. ANEXOS



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Resposta da matriz extracelular, angiogênica e proliferativa no adenocarcinoma de próstata em camundongos TRAMP frente ao tratamento com Nintedanibe" (protocolo nº 3649-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete / Ellen Nogueira Lima, 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.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 15 de dezembro de 2014.

Campinas, 15 de dezembro de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

Prof. Dra. Valéria H. A. Cagnon Quitete
Prof. Associado
Departamento de Anatomia / IB / UNICAMP

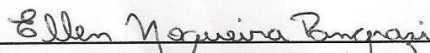
CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

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 **"Resposta da Matriz Extracelular e Angiogênese no Adenocarcinoma de Próstata em Camundongos TRAMP frente ao tratamento com Nintedanibe"**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 2016

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Ellen Nogueira Pangrazi**
RG n.º 48.485.278-4

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Valéria Helena Alves Cagnon Quitete**
RG n.º 16793069-2