



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ISABELA MARIA URRA ROSSETTO

MICROAMBIENTE DO ADENOCARCINOMA DE  
PRÓSTATA: EFEITO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO TEMPOL  
SOBRE MARCADORES DE INFLAMAÇÃO, ESTRESSE  
OXIDATIVO, PROLIFERAÇÃO E EXPRESSÃO DE MIRNAS

MICROENVIRONMENT OF PROSTATIC  
ADENOCARCINOMA: *IN VIVO* AND *IN VITRO* EFFECT OF  
TEMPOL ON INFLAMMATORY, OXIDATIVE STRESS,  
PROLIFERATION MARKERS AND MIRNAS

CAMPINAS

2023

**ISABELA MARIA URRA ROSSETTO**

**MICROAMBIENTE DO ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA:  
EFEITO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO TEMPOL SOBRE  
MARCADORES DE INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO,  
PROLIFERAÇÃO E EXPRESSÃO DE MIRNAS**

**MICROENVIRONMENT OF PROSTATIC ADENOCARCINOMA:  
*IN VIVO* AND *IN VITRO* EFFECT OF TEMPOL ON  
INFLAMMATORY, OXIDATIVE STRESS, PROLIFERATION  
MARKERS AND MIRNAS**

*Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do Título de  
Doutora em Biologia Molecular e  
Morfofuncional, na área de Anatomia.*

*Thesis presented to the Institute of  
Biology of the University of Campinas in  
partial fulfillment of the requirements for  
the degree of PhD in Molecular and  
Morphofunctional Biology, in the field of  
Anatomy.*

*Orientador: Prof.(a) Dr. (a) Valéria Helena Alves Cagnon Quitete*

*Co-Orientador: Professor Dr. Murilo Vieira Geraldo*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA  
ALUNA ISABELA MARIA URRA ROSSETTO E  
ORIENTADA PELA PROF.(A). DR.(A). VALÉRIA  
HELENA ALVES CAGNON QUITETE.

**CAMPINAS**

**2023**

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

R735m Rossetto, Isabela Maria Urra, 1995-  
Microambiente do adenocarcinoma de próstata : efeito *in vivo* e *in vitro* do tempol sobre marcadores de inflamação, estresse oxidativo, proliferação e expressão de miRNAs / Isabela Maria Urra Rossetto. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete.  
Coorientador: Murilo Vieira Geraldo.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Próstata - Câncer. 2. Inflamação. 3. Tempol. I. Cagnon, Valéria Helena Alves, 1967-. II. Geraldo, Murilo Vieira, 1979-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

#### Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Microenvironment of prostatic adenocarcinoma : *in vivo* and *in vitro* effect of tempol on inflammatory, oxidative stress, proliferation markers and miRNAs

**Palavras-chave em inglês:**

Prostate - Cancer

Inflammation

Tempol

**Área de concentração:** Anatomia

**Titulação:** Doutora em Biologia Molecular e Morfofuncional

**Banca examinadora:**

Valéria Helena Alves Cagnon Quitete [Orientador]

Rejane Maira Goés

Patrícia Simone Leite Vilamaior

Gabriela Bortolança Chiarotto

Cynthia Aparecida de Castro

**Data de defesa:** 22-09-2023

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Molecular e Morfofuncional

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-4286-921X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0894912384807148>

Campinas, 22 de setembro de 2023.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof.(a) Dr.(a). Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Prof.(a). Dr.(a). Patrícia Simone Leite Vilamaior

Prof.(a) Dr(a). Rejane Maira Goés

Prof.(a) Dr(a). Gabriela Bortolança Chiarotto

Prof.(a) Dr(a). Cynthia Aparecida de Castro

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

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Morfofuncional da Unidade Instituto de Biologia.

Dedico esta tese aos meus pais, os primeiros que me incentivaram e apoiaram. Dedico ao meu marido e aos meus filhos, aqueles que me deram forças para chegar até o final.

*“Cumpra o pequeno dever de cada momento: faz o que deves e está no que fazes”*

*São Josemaria Escrivá*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, minha mais sólida fortaleza e a verdadeira fonte de Sabedoria, e à Virgem Maria, Sua Santíssima Mãe, sob o título de Nossa Senhora Aparecida, por sua intercessão a fim de fortificar meus estudos, conduzir o seu curso e aperfeiçoar o seu fim.

Agradeço a meus pais, Márcio Aparecido Rosseto e Luciana de Fátima Urra Rosseto, pelo apoio e amor incondicional, por um dia terem encorajado os sonhos de uma jovem estudante.

Agradeço ao meu marido, João Paulo Guardabaxo Siqueira, que superou comigo todos os obstáculos, que dividiu momentos difíceis e de alegria, que fez meu caminho ser mais leve e feliz.

Agradeço à minha filha, Maria Teresa, que veio colorir nossos dias com seu sorriso e dar grande sentido à minha vocação.

Agradeço aos meus filhos que estão no Céu, Eli e Vicente, que me mostraram a beleza da maternidade apesar da dor.

Agradeço às minhas irmãs, Ana Clara e Maria Gabriela, por terem alegrado os meus finais de semana durante esses anos de distância.

Agradeço aos meus avós, Maria Aparecida, Maria Manoelina e João Urra, que intercederam do Céu por mim. E ao meu avô, Osmir Rosseto, que estando conosco, sempre me deu todo apoio.

Agradeço à minha orientadora, Valéria Helena Alves Cagnon Quitete, que me permitiu crescer como profissional devido aos seus ensinamentos e grande experiência. Agradeço por ter me recebido em seu laboratório e por ter me dado todo o suporte que um aluno necessita sem medir esforços.

Agradeço ao meu coorientador, Murilo Vieira Geraldo, pelo suporte durante esses anos de trabalho e por me ensinar a enxergar o conhecimento com grande entusiasmo.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Biologia da Reprodução por todo conhecimento profissional e pessoal compartilhado. Agradeço pelo companheirismo nos momentos de dificuldade e pela boa amizade.

Agradeço ao meu amigo e grande dupla de experimentos, Felipe Rabelo, por ter sido o meu braço direito durante esses anos.

Agradeço aos colegas Celina Lamas, Larissa Kido e Fábio Montico por terem sido fundamentais no meu crescimento profissional dentro do laboratório.

Agradeço à professora Dr.<sup>a</sup> Elaine Minatel pelas parcerias realizadas e pelo conhecimento compartilhada. Agradeço também a todos os alunos do Laboratório de Plasticidade Muscular, em especial à Heloína da Silva.

Agradeço o professor Dr. Marcos Salvador pelas contribuições que tanto enriqueceram o presente trabalho. Agradeço especialmente à sua aluna Mariana Mesquita pela parceria.

Agradeço aos alunos Leonardo Marson e Letícia Alves pelo grande auxílio nos experimentos finais desse presente trabalho.

Agradeço aos professores do Laboratório de Anatomia da Universidade Federal de São Carlos, Prof. Dr. Marcelo Martinez, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maíra Stefanini, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Salete de Oliveira e Prof. Dr. Luiz Takase, por terem sido fundamentais na escolha do meu caminho profissional e por terem fomentado em mim o primeiro amor pela docência e, em particular, pela Anatomia.

Agradeço ao amigo Bruno Henrique por ter me acompanhado nessa empreitada e grande aventura pela Unicamp. Sua amizade ao longo desses anos trouxe segurança e a lembrança de bons momentos.

Agradeço à funcionária Tanacy, pela amizade e por todo zelo em seu trabalho.

Agradeço à Nilza Ferreira e a Maria Aparecida de Oliveira pelos cuidados com a minha família, em particular pelo carinho com a Maria Teresa.

Agradeço aos técnicos do Laboratório de Anatomia da Unicamp, em particular ao técnico Roberto, por toda a ajuda durante esses anos.

Agradeço à secretaria de Pós-Graduação do Instituto de Biologia, pela organização e preocupação com os alunos, pela contribuição direta e indireta para a realização desse trabalho.

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas por ter me proporcionado experiências de excelência em ensino, pesquisa e extensão durante esses anos de pós-graduação.



Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural à sua coordenação pelo incentivo à ciência e ao aprimoramento acadêmico de seus alunos.

Agradeço à Fundação de Amparo da Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2018/21647-6 e 2021/02108-0), pelo suporte financeiro dado a esse trabalho de pesquisa. E aos órgãos de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio à pesquisa em nosso país apesar das dificuldades. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Aos membros da banca pela atenção, disponibilidade e por aceitarem o convite.

A todos que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AD: Adenocarcinoma bem-diferenciado
- ANOVA: Análise de variância
- AR: Androgen receptor
- BAX: BCL2 associated X
- BCL-2: B-cell lymphoma 2
- BCL2L1: BCL2 like 1
- BSA: Bovine Serum Albumin
- C: Control
- CaP: Câncer de próstata
- CAT: Catalase
- cDNA: DNA complementar
- cel*: *Caenorhabditis elegans*
- COX-2: Ciclooxygenase-2
- CT: cycle threshold
- DHT: Di-hidrotestosterona
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DNA: Deoxyribonucleic acid
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
- Ef: Eficiência (da reação de PCR)
- ERN's: Espécies reativas de nitrogênio
- ERO's: Espécies reativas de oxigênio
- ER- $\alpha$ : Estrogen Receptors Alpha
- ES: Epitélio saudável
- FGF: Fibroblast growth factor
- GC: Glândula de coagulação
- GPx: Glutathione peroxidase
- GSH: Glutathione
- GSSH: Glutathione disulfide
- HE: Healthy epithelium
- HGPIN: High-grade prostatic intraepithelial neoplasia

HPB: Hiperplasia prostática benigna

HRP: Horseradish peroxidase

*hsa: Homo sapiens*

IC<sub>50</sub>: Concentração inibitória média

IFN- $\gamma$ : Intereferon gamma

IGF: Insulin-like growth factor

IHC: Immunohistochemistry

iKB- $\alpha$ : NF-kappa-B inhibitor alpha

iKB- $\beta$ : NF-kappa-B inhibitor beta

iKK: iKB kinase

IL: Interleucina

INCA: Instituto Nacional do Câncer

iNOS: Inducible isoform of nitric oxide synthase

JAK: Janus kinase

LDH: Lactato desidrogenase

LDL: Lobo dorsolateral da próstata

LGPIN: Low-grade prostatic intraepithelial neoplasia

LV: Lobo ventral da próstata

MCF-7L: Cellosaurus cell line

MIEN1: Migration And Invasion Enhancer 1

miRNA: micro ribonucleic acid

*mmu: Mus musculus*

MPO: Metaloproteinase

mRNA: messenger ribonucleic acid

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

MyD88: Myeloid differentiation primary response 887

NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NF $\kappa$ B: Nuclear factor kappa-B

NIP-: Neoplasia intraepitelial de baixo grau

NIP+: Neoplasia intraepitelial de alto grau

NRF2: Nuclear factor erythroid-2-related factor 2

OXPPOS: Mitochondrial oxidative phosphorylation

PCa: Prostate cancer

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

PEG-SOD: Superoxide dismutase - polyethylene glycol

PGC-1 $\alpha$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

PIA: Proliferative inflammatory atrophy

pNF $\kappa$ B: Phosphorylated Nuclear factor Kappa B

PSA: Prostate Specific Antigen

pSTAT-3: Phosphorylated Signal transducer and activator of transcription 3

PTGS2: Prostaglandin-endoperoxide synthase 2

qPCR: PCR quantitativo

RELA: v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A

RNA: Ribonucleic acid

RNU6B: RNA U6 Small Nuclear 6

RPL19: Ribosomal Protein L19

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR: Reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase

SDS: Sodium dodecyl sulfate

SERBP1: Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein

SFB: Soro fetal bovino

SOD: Superóxido dismutase

STAT-3: Signal transducers and activators of transcription-3

SV40: Simian vacuolating virus 40

TBS-T: Tris-buffered saline solution

TGF: Tumor growth factor

TLR2: Toll-like receptor 2

TLR4: Toll-like receptor 4

TNB: Trinitrobenzene sulfonic acid

TNF: Tumor necrosis factor

TPL: Tempol

TRAMP: Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate

U6 snRNA: U6 spliceosomal RNA

UA: Undifferentiated adenocarcinoma

UBE2C: Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C

VDAC: Voltage-dependent anion channel

VS: Vesícula seminal

WB: Western blotting

WDA: Well-differentiated adenocarcinoma

## RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é a segunda maior causa de mortes por câncer no mundo. A inflamação e o estresse oxidativo podem ser apontados como fatores fundamentais na patogênese do CaP, levando ao repetido processo de dano e regeneração tecidual e ao desequilíbrio do microambiente glandular. O tempol, potente antioxidante, tem se mostrado um tratamento coadjuvante promissor em diversos tipos de cânceres. Porém, estudos avaliando suas ações na próstata são escassos e contraditórios. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de diferentes dosagens do tratamento com tempol, *in vitro* e *in vivo*, sobre o microambiente do adenocarcinoma de próstata em diferentes estágios de progressão dessa doença, analisando parâmetros de proliferação tecidual, de inflamação, de estresse oxidativo, de resposta mitocondrial, e de expressão de miRNAs. *In vitro*, a resposta das linhagens celulares PC-3 e LnCaP foi verificada frente a diferentes tempos e dosagens de tratamento com tempol. *In vivo*, as respostas do lobo ventral da próstata no modelo TRAMP foram verificadas em dois estágios de progressão da doença: estágio inicial (grupos CT12 e TPL12) e estágio avançado (grupos CT20, TPL20-I e TPL20-II). Os camundongos foram tratados por gavagem com doses de 50 ou 100 mg/Kg de tempol diluído em água, durante quatro semanas, sendo 5 dias de tratamento por semana. Após o término do período experimental, o lobo ventral foi processado para análises morfológicas, imunohistoquímicas, de níveis proteicos (western blotting), de atividade enzimática e de expressão gênica (RT-PCR). Os resultados apontaram que o tempol teve ação antiproliferativa, e papel preponderante na diminuição da inflamação tanto *in vitro* quanto *in vivo*, diminuiu receptores tipo toll e aumento inibidores de NFκB. Alterou também parâmetros relacionados a sobrevivência celular, como STAT-3 e BCL2. Esse nitróxido atuou como antioxidante, aumentando os níveis endógenos de SOD2 e atuando como um agente semelhante à catalase. O tempol levou a diminuição de componentes da OXPHOS e diminuição de PGC-1α, impedindo o tecido de corresponder ao aumento das demandas energéticas da célula. De forma generalizada, o tempol aumentou a expressão dos miRNAs 26-5p, 26a-5p e 155-5p nas condições estudadas, e modulou diferencialmente genes da via do NFκB, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Particularmente no estágio avançado, a dose-resposta ao tratamento com o tempol não foi evidenciada para os níveis proteicos, uma vez que o dobro da dose oferecida aos animais não levou a efeitos superiores aos observados com a dose menor de tratamento. No entanto, se considerados os aspectos moleculares de expressão gênica, o tempol levou ao aumento significativo dos níveis de miRNAs let-7c-5p, miR-26a-5p e miR-155-5p para o grupo TPL20-II quando comparado aos grupos CT20 e TPL20-I. Isto posto, constatou-se que as ações do tempol foram efetivas, porém diversas, no microambiente do adenocarcinoma de próstata,

indicando respostas diferenciais *in vitro*, de acordo com a dependência hormonal das linhagens celulares e, *in vivo*, tendo como base o estágio de progressão das lesões no tecido.

## ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is the second leading cause of cancer deaths worldwide. Inflammation and oxidative stress can be identified as fundamental factors in the pathogenesis of PCa, leading to a repeated process of tissue damage and regeneration and an imbalance in the glandular microenvironment. Tempol, a potent antioxidant, has been shown to be a promising adjuvant treatment for several types of cancer. However, studies evaluating its effects on the prostate are scarce and contradictory. The aim of this study was to evaluate the effects of different dosages of tempol treatment, *in vitro* and *in vivo*, on the microenvironment of prostate adenocarcinoma at different stages of progression of this disease, analyzing parameters of tissue proliferation, inflammation, oxidative stress, mitochondrial response and expression of miRNAs. *In vitro*, the response of the PC-3 and LnCaP cell lines was checked after different times and dosages of tempol treatment. *In vivo*, the responses of the prostate ventral lobe in the TRAMP model were verified at two stages of disease progression: early stage (groups CT12 and TPL12) and advanced stage (groups CT20, TPL20-I AND TPL20-II). The mice were treated by gavage with doses of 50 or 100 mg/Kg of tempol diluted in water for four weeks, treating them 5 days a week. After the end of the experimental period, the ventral lobe was processed for morphological, immunohistochemical, protein level (western blotting), enzyme activity and gene expression (RT-PCR) analyses. The results showed that tempol had an antiproliferative action and a preponderant role in reducing inflammation both *in vitro* and *in vivo*, downregulating toll receptors and increasing NF $\kappa$ B inhibitors. It also altered parameters related to cell survival, such as STAT-3 and BCL2. This nitroxide acted as an antioxidant, increasing endogenous levels of SOD2 and acting as a catalase-like agent. Tempol led to a decrease in OXPHOS components and a decrease in PGC-1 $\alpha$ , preventing the tissue from matching the cell's increased energy demands. In general, tempol increased the expression of miRNAs 26-5p, 26a-5p and 155-5p under the conditions studied, and differentially modulated genes of the NF $\kappa$ B pathway, both *in vitro* and *in vivo*. Particularly in the advanced stage, the dose-response to treatment with tempol was not evident for protein levels, since doubling the dose offered to the animals did not lead to effects greater than those observed with the lower treatment dose. However, if we consider the molecular aspects of gene expression, tempol led to a significant increase in the levels of miRNAs let-7c-5p, miR-26a-5p and miR-155-5p for the TPL20-II group when compared to the CT20 and TPL20-I groups. Therefore, it was found that the actions of tempol were effective, but diverse, in the prostate adenocarcinoma microenvironment,



indicating differential responses *in vitro*, according to the hormonal dependence of the cell lines and, *in vivo*, based on the stage of progression of the lesions in the tissue.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
1.1. MORFOFISIOLOGIA DA PRÓSTATA E CÂNCER .....	20
1.2. MODELOS PRÉ-CLÍNICOS PARA O ESTUDO DO CÂNCER DE PRÓSTATA.....	21
1.3. INFLAMAÇÃO E MICROAMBIENTE PROSTÁTICO.....	24
1.4. TEMPOL: MECANISMOS DE AÇÃO E POTENCIAL TERAPÊUTICO.....	27
1.5. MIRNAS E CÂNCER DE PRÓSTATA .....	30
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>32</b>
<b>3. OBJETIVO GERAL DA TESE.....</b>	<b>33</b>
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>4. ESTRUTURA DA APRESENTAÇÃO DA TESE.....</b>	<b>35</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS GERAIS DA TESE.....</b>	<b>37</b>
5.1. ANÁLISES <i>IN VITRO</i> : CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS PROSTÁTICAS.....	37
5.1.1. Análise da viabilidade celular pela técnica de MTT .....	37
5.1.2. IC <sub>50</sub> e escolha de dose para tratamento.....	38
5.1.3. Análise da viabilidade celular pela técnica de Trypan Blue.....	38
5.1.4. Western Blotting para cultura celular .....	39
5.1.5. Detecção <i>in vitro</i> de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	40
5.2. ANÁLISES <i>IN VIVO</i> : ANIMAIS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	41
5.2.1. Análises histopatológicas por microscopia de luz.....	42
5.2.2. Contagem de Células PCNA- Positivas para o Índice Proliferativo .....	43
5.2.3. Imunohistoquímica de antígenos.....	43
5.2.4. Extração de proteínas e Western Blotting .....	44
5.2.5. Dosagens plasmáticas.....	44
5.2.6. Análises estatísticas para os experimentos <i>in vivo</i> .....	45
5.3. ANÁLISES <i>IN SILICO</i> .....	45
5.3.1. Análise experimental de mRNAs e miRNAs <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	45
5.3.2. Detecção dos miRNAs no plasma dos camundongos TRAMP .....	47
5.3.3. Análise de enriquecimento gênico funcional .....	48
<b>A. ARTIGO CIENTÍFICO I.....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURES FILE – ARTIGO I.....</b>	<b>68</b>

<b>SUPPLEMENTARY MATERIAL – ARTIGO I.....</b>	<b>78</b>
<b>B. ARTIGO CIENTÍFICO II.....</b>	<b>84</b>
<b>FIGURES FILE – ARTIGO II.....</b>	<b>101</b>
<b>C. ARTIGO CIENTÍFICO III:.....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>149</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Morfofisiologia da próstata e câncer

A próstata é uma glândula acessória do sistema reprodutor masculino, situada em torno da uretra, cuja secreção desempenha um papel fundamental no processo reprodutivo (Price & Williams-Ashman, 1961; Cavazos, 1975). Participa da composição do sêmen e propicia condições favoráveis para a capacitação e sobrevivência dos espermatozóides (Lin & Bissell, 1993; Bull et al., 2001). No ser humano, a próstata é um órgão fibromuscular e é usualmente descrita como uma pirâmide invertida, cuja base está aplicada ao colo da bexiga urinária, e cujo ápice descansa sobre a fâscia que reveste o diafragma urogenital (Dângelo e Fattini, 2011). A uretra prostática atravessa todo o comprimento da próstata, da base ao ápice. Descrevem-se na próstata humana lobos direito, esquerdo e médio, sendo que este último se projeta internamente, a partir da parte superior da face posterior do órgão. Os ductos das glândulas da próstata abrem-se no seio prostático, um sulco existente de cada lado da crista uretral (Dângelo e Fattini, 2011).

A próstata desperta grande interesse para estudos, uma vez que, entre várias espécies de mamíferos, incluindo seres humanos, cães e roedores, ela apresenta altas taxas de incidência de Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) e Câncer de Próstata (CaP). (DeMarzo et al., 1999). O CaP representa cerca de 29% dos cânceres que atingem a população masculina no Brasil (INCA, 2020). Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontam para mais de 65 mil novos casos de CaP a cada ano, entre 2020 e 2022 (INCA, 2020).

Histologicamente, a próstata é constituída por um conjunto de estruturas túbulo-alveolares de epitélio secretor classificado como simples, formado por células colunares altas, chamadas também de células luminais (Aumüller & Seitz, 1990). Além das células luminais, também são observadas células basais, que desempenham um papel fundamental no transporte e na distribuição de substâncias entre as regiões epiteliais e estromais (Garraway et al., 2003). Tais células não apresentam receptores androgênicos e constituem células-tronco epiteliais (McNeal, 1988; Abate-Shen&Shen, 2000; Garraway et al., 2003). Também, células neuroendócrinas são identificadas nos ácinos, de função essencialmente regulatória, sendo responsáveis a peptídeos como a somatostatina, calcitonina e neurotensina (Roehrborn & McConnell, 2002). O conjunto dos ácinos prostáticos encontra-se circundado pelo estroma prostático, que é formado por um complexo arranjo de células, predominantemente fibroblastos e células musculares lisas, envoltas por matriz extracelular e moléculas reguladoras, as quais provêm sinais biológicos que exercem influência sobre as células epiteliais (Tuxhorn et al., 2001; Cunha & Matrisian, 2002; Sanches et al., 2021). É esta a interação entre estroma e epitélio, um fator de influência intrínseco na próstata, que mantém a diferenciação funcional e o

crescimento ou a quiescência das células luminais (Hayward et al., 1997), auxiliando no reparo tecidual em resposta a lesões (Tuxhorn et al., 2001). Dessa forma, o desequilíbrio da interação epitélio-estroma, que pode ser consequência de ampla variedade de processos, é um dos fatores que favorece a formação do adenocarcinoma prostático (Cunha et al., 2003).

Como fatores intrínsecos que influenciam as populações celulares da próstata, destacam-se os peptídeos hormonais, como a prolactina, e fatores de crescimento (Insulin-Growth-Factor, IGF; Fibroblast-Growth-Factor, FGF; Tumor-Growth-Factor, TGF). A prolactina desempenha papel de estímulo direto do epitélio prostático e inibição da apoptose de células epiteliais (Nevalainen et al., 1991). Dentre os fatores extrínsecos, é reconhecido que a próstata sofre influência da ação de hormônios esteroidais e, dentre estes, os andrógenos são importantes responsáveis pela mediação das interações entre epitélio e estroma (Leav et al., 2001). Os andrógenos direcionam o desenvolvimento do epitélio por meio de mecanismos parácrinos, os quais são mediados por receptores androgênicos presentes no estroma glandular (Cunha et al., 1992). A testosterona, cuja principal fonte são os testículos, e a dihidrotestosterona (DHT), metabólito biologicamente ativo da testosterona, tratam-se dos mais importantes andrógenos no homem (Sinowatz et al., 1995), responsáveis por induzir a diferenciação prostática (Hsing, 2001). Sinergicamente à testosterona, os estrógenos atuam também na próstata, agindo de forma indireta através do eixo hipotálamo-hipófise, suprimindo a liberação de gonadotrofinas (Cunha et al., 2003). Assim, a secreção de andrógeno testicular reduzida leva a involução da próstata (Sinowatz et al., 1995). A ação de estrógenos na próstata é intensamente estudada, sendo que o desbalanço na produção desse hormônio, favorece as lesões comumente encontradas na próstata de indivíduos senis, sendo sua ação mediada pelos seus receptores ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  (Morais-Santos et al., 2018). Segundo Gonzaga e colaboradores (2016), o envelhecimento leva ao aumento da proliferação de células epiteliais em áreas específicas da próstata, juntamente com a diminuição da taxa de apoptose, sugerindo a ruptura da homeostase tecidual.

## **1.2. Modelos pré-clínicos para o estudo do câncer de próstata**

Apesar de todas essas considerações, os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento e progressão do CaP ainda não foram completamente estabelecidos, fazendo deste tipo de câncer uma doença pouco homogênea e uma das mais desafiadoras malignidades da oncologia urogenital (Cai et al., 2019).

Para o estudo *in vitro*, diferentes modelos pré-clínicos têm sido desenvolvidos para esclarecer a patofisiologia do CaP. Tradicionalmente, linhagens celulares derivadas de lesões

metastáticas humanas, como as linhagens PC-3 e LNCaP são ferramentas muito úteis para os estudos sobre a tumorigênese e a resistência a drogas (Namekawa et al., 2019). Estas apresentam diferenças quanto à expressão do receptor de andrógeno, AR, sendo caracterizada, portanto, por sua independência (PC-3) ou dependência androgênica (LNCaP).

A linhagem celular PC-3 foi obtida a partir de tumor metastático localizado em uma vértebra lombar de um homem de 62 anos de idade, tratado inicialmente com dietilestilbestrol e depois submetido a orquiectomia bilateral (Kaighn et al., 1979). Essas células apresentam ausência de cromossomo Y e número de cromossomo de 62 na passagem 5 e 58 na passagem 30. Além de não expressarem receptor de andrógeno, a linhagem PC-3 não expressa PSA, antígeno prostático específico (Webber et al., 1997).

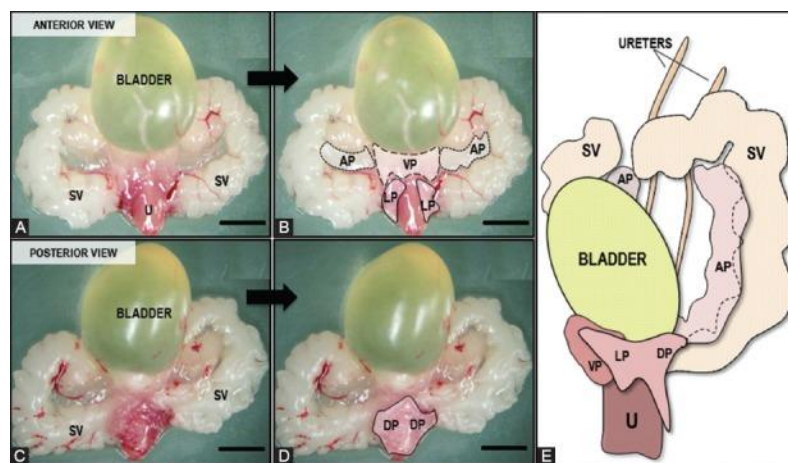
A linhagem celular LNCaP foi derivada de fragmentos de biópsia da metástase de linfonodo de um homem de 50 anos com CaP moderadamente diferenciado, diagnosticado cerca de um ano antes. Esse homem foi tratado com estrógeno e posteriormente submetido a orquiectomia, além de receber tratamento com cisplatina, porém a doença progrediu (Horoszewicz et al., 1980). As células LNCaP apresentam morfologia estrelada e baixo potencial de ancoramento, não produzindo uma monocamada uniforme em cultura. O número de cromossomos dessa linhagem é de 76, variando de 33 a 91 cromossomos. Apresentam alta afinidade por andrógenos e expressam PSA (Berns, Boer & Mulder, 1986; Webber et al., 1997).

Apesar das limitações, as linhagens de células de CaP humana imortalizadas e malignas fornecem modelos úteis para identificar não apenas agentes quimiopreventivos, mas também agentes que podem impedir a progressão do tumor, bloqueando a angiogênese, inflamação, invasão e metástase (Webber et al., 1997).

Para o estudo *in vivo*, tem se destacado os modelos murinos geneticamente modificados (Berman-Booty et al., 2012). Tais modelos são vantajosos pois permitem que as etapas da iniciação e progressão do câncer sejam avaliadas em um sistema no qual tanto os componentes genéticos quanto os ambientais podem ser controlados (Chiaverotti et al., 2008; Berman-Booty et al., 2012). Além disso, os murinos apresentam curto período gestacional e pouca necessidade de espaço físico para suas acomodações, otimizando processos experimentais (Oliveira et al., 2016; Kido et al., 2019).

Nos roedores, anatomicamente, a próstata está dividida em quatro pares de lobos: ventral, dorsal, lateral e anterior, sendo os três primeiros localizados ao redor da uretra prostática (Figura 1). O par de lobos anteriores são usualmente nomeados como glândula de coagulação e estão localizados na face côncava das vesículas seminais. Os outros pares de lobos recebem seus nomes de acordo com o seu posicionamento em relação à uretra do animal (Cunha

et al., 2019) sendo que, o lobo dorsal e lateral podem ser descritos em conjunto, sendo denominados de dorsolateral (Sugimura et al., 1986). O estudo da próstata de roedores é particularmente interessante visto que os lobos da próstata desses animais são funcionalmente similares à próstata humana e, assim como no homem, cada um deles possui suas características morfológicas próprias, secretam diferentes elementos e apresentam respostas diferenciais frente à estimulação hormonal (Jesik et al., 1982; Cunha et al., 2019). Conforme mencionado por Slayter et al. (1994), o lobo ventral da próstata é amplamente empregado em pesquisas sobre carcinogênese prostática, devido à sua forte dependência androgênica e semelhança com o câncer de próstata humano, embora não haja uma homologia direta entre esses órgãos.



**Figura 1.** Imagem macroscópica do sistema urogenital masculino de camundongos. (A) Vista frontal e (C) vista dorsal dos órgãos dissecados de um camundongo macho adulto. Uretra (U), Vesículas seminais (SV); (B) e (D) delimitam com linhas tracejadas e pontilhadas os lobos prostáticos ventral (VP), lateral (LP), anterior (AP) e dorsal (DP); (E) Vista anterolateral (lado esquerdo) dos lobos da próstata em relação à bexiga, vesículas seminais e uretra (Modificado de: Sugimura, Y., et al. 1986). Barra de escala, 1 cm. Imagem e legenda adaptadas de Oliveira, D., et al. 2016)

Dentre os modelos experimentais mais utilizados para o estudo do CaP, o modelo transgênico de camundongo para adenocarcinoma de próstata (TRAMP) encontra-se bem estabelecido na literatura e oferece vantagens para o estudo de agentes de quimioprevenção, apresentando progressão bem definida da doença e alta incidência de carcinoma pouco diferenciado em curto período de tempo (Kido et al., 2019). O modelo TRAMP expressa as oncoproteínas virais SV40 nas células luminiais prostáticas, reguladas pelo promotor androgênio-responsivo do gene probasina de rato. Esse processo bloqueia a atividade de genes supressores de tumor importantes (Berman-Booty et al., 2012). A ampla utilização desse modelo para estudos moleculares do câncer se deve às suas diversas características compartilhadas com o câncer humano, incluindo metástases à distância, progressão para a independência androgênica e diferenciação neuroendócrina (Chiaverotti et al., 2008). O

estadiamento e a caracterização das lesões no modelo TRAMP encontra-se bem padronizado na literatura, sendo assim, os camundongos TRAMP são considerados modelos de grande relevância para o estudo de agentes de quimioprevenção e abordagens pré-clínicas (Suttie et al., 2003; Kido et al., 2019).

### **1.3. Inflamação e microambiente prostático**

Estudos têm focado no entendimento do papel da inflamação no desenvolvimento do CaP, baseando-se na hipótese de que as lesões inflamatórias podem levar à carcinogênese por meio de estresse celular e danos genômicos repetidos (Grivennikov, Greten & Karin, 2010). Virchow, em 1863, já hipotetizava que a origem do câncer estava em um sítio de inflamação crônica, no qual as injúrias teciduais, juntamente com a resultante inflamação, provocavam aumento da proliferação celular (Balkwill & Mantovani, 2001). Tal constatação foi sendo consolidada, e hoje tem-se que ocorre significativo aumento na probabilidade de incidência de adenocarcinoma prostático em pacientes com histórico de doença inflamatória prostática, como por exemplo, prostatite crônica clínica (Perletti et al., 2017).

A patogênese da inflamação associada ao câncer é complexa e envolve participação da resposta imune inata e adaptativa (Coussens & Werb, 2002; Hatano, Fujita & Nonomura, 2020). As células imunes ativas são as fontes de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e prostaglandinas (Grivennikov; Greten; Karin, 2010). A ativação da resposta inflamatória é capaz de favorecer o microambiente prostático para a iniciação e progressão tumoral através de danos no DNA celular associadas às alterações nos níveis de expressão de miRNAs, culminando na promoção de proliferação celular, inibição da apoptose, estimulação da angiogênese e modulação dos processos de migração e adesão celular (Grivennikov; Greten; Karin, 2010; Nguyen et al., 2013).

Assim, o fator de transcrição “chave” NF $\kappa$ B vem sendo reconhecido como o principal efetor dos processos pró-inflamatórios envolvidos na patogênese do CaP (Nguyen et al., 2013). A ativação do NF $\kappa$ B ocorre não apenas nas células inflamatórias, mas também nas células cancerosas (Shukla et al., 2004). Uma série de estímulos que incluem antígenos virais ou bacterianos, citocinas e fatores de crescimento da superfamília do receptor TNF ou receptores tipo toll (TLR's) podem ativar o NF $\kappa$ B (Nguyen et al., 2013). König e colaboradores (2004) relataram expressão dos receptores TLR4, 5, 7 e 9 aumentada em amostras teciduais de HPB e dos TLR's 1, 2 e 3 aumentada para CaP, levando a consequente produção de citocinas inflamatórias. Por sua vez, estas citocinas, tais como TNF- $\alpha$  e IL-1, ativam o NF $\kappa$ B, amplificando a resposta inflamatória (Pahl, 1999). As vias canônicas e não canônicas da



ativação do NF $\kappa$ B e sua translocação para o núcleo da célula envolvem ainda diversas moléculas intermediárias, como os i $\kappa$ B- $\alpha$  e i $\kappa$ B- $\beta$ , e os complexos iKK's, que promovem a regulação desse fator de transcrição (Nguyen et al., 2013). Em outros estudos, a presença de NF $\kappa$ B foi significativamente aumentada na ocorrência de lesões como neoplasias intraepiteliais prostáticas (NIP's) (Narayanan et al., 2009; Staal & Beyaert, 2018). E, a produção de IL-1 $\beta$ , induzida pelo NF $\kappa$ B, foi capaz de manter o estado de inflamação crônica e atrofia inflamatória proliferativa (PIA) na próstata, condições reconhecidas como fatores precursores no desenvolvimento do câncer (Coussens & Werb, 2002).

Com relação ao papel as interleucinas, as IL6, IL8 e IL17 são consideradas interleucinas promotoras de tumor em diversos modelos experimentais e em pacientes (Culig, 2014). A IL6 leva ao crescimento de tumores prostáticos principalmente via JAK/STAT3 (Gu et al., 2014) e via ativação dos receptores de andrógeno (Malinowska et al., 2009). Além disso, a IL6 leva a produção da COX-2 no ambiente tumoral (De Nunzio et al., 2011; Hamid et al., 2011) sendo essa uma enzima catalisadora da conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas, em particular a prostaglandina E2 (Kirschenbaum et al., 2001). A COX-2 não é comumente expressa em células saudáveis do epitélio prostático (Hsu et al, 2000) e sua inibição seletiva parece ser capaz de prevenir a ativação de macrófagos e a expressão de iNOS e NF $\kappa$ B na carcinogênese da próstata (Narayanan et al, 2008; Kido et al., 2016). A IL8 é capaz de aumentar a atividade dos receptores de andrógeno no CaP, o que pode corroborar com a sobrevivência celular durante a privação de andrógenos (Seaton et al., 2008). A IL-17 possui alta capacidade de estimular a produção de outras interleucinas (IL-6, IL-8 e TGF- $\beta$ ), com papel chave no microambiente inflamatório (Steiner et al., 2003). Segundo Alves et al. (2018), atraso na progressão do CaP foi verificado, além de diminuição dos níveis de expressão de IL-17 e COX-2 no lobo ventral de camundongos TRAMP, após o tratamento com Nintedanibe, um medicamento primariamente anti-angiogênico, mas que apresenta ações também sobre os marcadores inflamatórios. Muitos outros estudos tem focado o controle da inflamação através de diversas terapias no CaP (Kido et al., 2022; Montico et al., 2023)

É de relevância biológica salientar que a inflamação, como um dos eixos da carcinogênese, está diretamente relacionada ao processo de estresse oxidativo/nitrosativo. O estresse oxidativo/nitrosativo é reconhecido como agravante dos danos teciduais e tido também como um dos eixos da carcinogênese pela capacidade de amplificação das respostas inflamatórias e angiogênicas (Hamid et al., 2011). Os estresses oxidativo e nitrosativo são definidos pelo desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio e a capacidade biológica do tecido em reparar os danos provenientes desses produtos e de

neutralizar os seus efeitos reativos, mantendo seus níveis dentro de uma faixa de normalidade (Lugrin et al., 2014; Paulis, 2018).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO's e ERN's) podem gerar danos na estrutura e função celular, levando a alterações genômicas e pós-translacionais, incluindo aquelas envolvidas no reparo do DNA e na apoptose (Sciarra et al., 2008). A alteração do estado redox pode levar a manutenção do estado inflamatório (Lugrin et al., 2014) uma vez que, ao se instalar um processo inflamatório, ERO's e ERN's são criadas a fim de combater os patógenos e estimular o reparo tecidual e a regeneração (Cai et al., 2019). No entanto, essas espécies reativas podem danificar o DNA, promovendo mutações que iniciarão o câncer (Fishbein et al., 2020). Dessa forma, as vias de reparo do DNA são essenciais para prevenir estes potenciais danos, mas, a presença ERN's no microambiente tecidual é também capaz de interferir nesses mecanismos de reparo, reduzindo a sua eficácia. Além disso, as respostas celulares ao DNA danificado, como sinalizações de dano ou citotoxicidade, podem induzir a expressão de moléculas inflamatórias, criando retroalimentação positiva (Cai et al., 2019; Fishbein et al., 2020). A inflamação crônica leva, conseqüentemente, a produção de altas taxas de citocinas pró-inflamatórias e hiperprodução de ERO's e ERN's, como subsequente ativação de NF- $\kappa$ B e expressão de genes que codificam para o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , iNOS, e IL-17 (Paulis, 2018).

A literatura tem apontado que o estresse oxidativo é uma das causas primárias de dano endotelial vascular, pois níveis de EROs, podem induzir disfunção endotelial vascular, através da inibição da produção de óxido nítrico (Ohtake et al., 2018). A isquemia pode aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio, fatores de crescimento e citocinas, induzindo a neoangiogênese, resultando na progressão do CaP (De Nunzio et al., 2012; Ohtake et al., 2018).

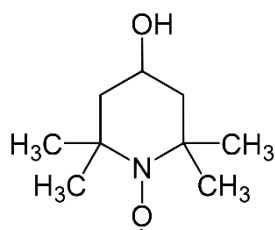
Em condições normais há um eficiente sistema de detoxificação celular, que inclui enzimas como a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (Cat) e a Glutathione Peroxidase (GPX) (Sciarra et al., 2008). No entanto, concomitantemente à tumorigênese, é comum a ocorrência de declínio da atividade das enzimas antioxidantes no tecido avaliado (LaBanca et al., 2015). Recentemente, Ahmed-Amar et al. (2018) verificaram que os níveis da SOD, Catalase e Glutathione reduzida (GSH) estavam significativamente reduzidos em amostras teciduais de pacientes diagnosticados com CaP em relação às amostras de tecido saudável.

A Superóxido Dismutase (SOD), especificamente a SOD2 (enzima antioxidante mitocondrial) é responsável pela catalização da conversão do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Gelain et al., 2009). A expressão da SOD2 encontra-se comumente diminuída nas células cancerosas de diversos tecidos, inclusive na próstata

(Ahmed-Ammar et al., 2018). O nível da SOD2 tende a declinar progressivamente durante a transição da NIP para o câncer andrógênio-dependente e ainda mais na transição deste último para o câncer andrógênio-independente (Bostwick et al., 2000; Baker, Oberley & Cohen, 1997). Dessa forma, a utilização de miméticos da SOD vem sendo estudada visando o aumento das defesas antioxidantes naturais das células, apontando benefícios em modelos animais para doenças cuja progressão está relacionada ao nível do estresse oxidativo (Muscoli et al., 2003). A liberação de citocinas pró-inflamatórias é regulada pela presença de ânion superóxido e, dessa forma, miméticos da SOD tem o papel na inibição de diversas citocinas, incluindo o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, de acordo com Salvemini et al. (2001) para modelos de inflamação aguda e também por Riley et al. (1996) para a inflamação crônica. Ainda, o seu uso parece também exercer efeitos no processo proliferativo, indicando não somente a diminuição da incidência de tumores como também a inibição do crescimento tumoral *in vivo* e *in vitro* (Gariboldi et al., 1998; Gariboldi et al., 2003).

#### 1.4. Tempol: mecanismos de ação e potencial terapêutico

O tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil) é um sintético não tóxico, solúvel em água, estável e de baixo peso molecular, permeável à membrana celular, membro da família dos nitróxidos, que vem sendo estudado ao longo dos anos em modelos animais de lesões associadas ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Krishna, 1994; Offer, Russo & Samuni, 2000; Wilcox, 2010; Silva et al., 2020). O tempol apresenta relevante capacidade de eliminar tais espécies reativas e de reduzir processos oxidativos teciduais, sendo caracterizado como potente antioxidante (Augusto et al., 2008). Considerando a estrutura química do tempol (Figura 2), essa é capaz de se transpor entre o radical nitróxido, a hidroxilamina reduzida e a forma de cátion oxoamônio oxidado com reações de transferência de 1 e 2 elétrons, facilitadas pelas mudanças conformacionais “*boat and chair*” que fundamentam a rapidez e a natureza catalítica de suas reações (Wilcox, 2010).



**Figura 2.** Estrutura química do tempol, 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil, composto heterocíclico de massa molar igual a 172,248 g/mol. Fonte: [www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/aldrich/176141](http://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/aldrich/176141)

Um dos mecanismos de ação do tempol é a reação com o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) para a formação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o que confere a esse composto comportamento “mimético da superóxido dismutase”. Esta propriedade é uma das ações que indica os nitróxidos de interesse biológico e ao qual, inicialmente, foram atribuídos seus efeitos protetivos (Samuni et al., 1991). Embora as taxas de reação entre tempol e o ânion superóxido sejam variáveis, estudos reportaram que a efetividade do tempol em catalisar o  $O_2^-$  foi considerada semelhante ao da SOD nativa e ligeiramente menor do que a capacidade da PEG-SOD (Luo et al., 2009). No entanto, outros mecanismos de ação dos nitróxidos foram sendo observados e, dentre eles, destaca-se sua capacidade de se comportar como um sequestrador de radicais (Pattison et al., 2012; Samuni, Samuni & Goldstein, 2013) ou um redutor de hemeoproteínas, conferindo-lhes comportamento semelhante à catalase (Rees et al., 2009). Ainda, alguns estudos tem reportado importante ação do tempol na inibição da mieloperoxidase (MPO) (Vaz & Augusto, 2006; Queiroz, Vaz & Augusto, 2011), na inibição do processo de peroxidação lipídica (Miura, Utsumi & Hamada, 1993; Soule et al., 2007) e na migração de neutrófilos (Queiroz et al., 2012). Além disso, tem sido observada a capacidade dos nitróxidos e, em particular do tempol, de ativar a via do Nrf2, fator de transcrição responsável por mecanismos de defesa endógenos, fornecendo proteção contra danos celulares, o que elucidada mais um mecanismo de ação através do qual estes compostos podem oferecer proteção aos danos trazidos pelo estresse oxidativo (Greenwald et al., 2014; Greenwald et al., 2015; Silva et al., 2020).

Devido a ampla capacidade em atuar sobre a produção, redução ou neutralização de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, diferentes estudos reportaram ação do tempol diretamente sobre os processos inflamatórios, particularmente, sobre o NF $\kappa$ B (Cuzzocrea et al., 2004). Segundo Volk et al. (2000), o tempol inibiu consideravelmente a liberação de citocinas em cultura de células endoteliais e reduziu a exsudação pleural em modelo animal de pleurite induzida (Kurihara et al., 2002). Além disso, o mesmo atrasou as manifestações sintomáticas em modelo murino de artrite (Cuzzocrea et al., 2000) e reduziu a inflamação em modelo animal para periodontite (Di et al., 2005). Os mecanismos de proteção relacionados ao tempol ainda não são completamente conhecidos, mas sabe-se que as ações antiinflamatórias e antioxidantes dos nitróxidos estão intimamente associadas (Cuzzocrea et al., 2004).

Augusto et al. (2008) propõem que os nitróxidos atenuam as injúrias teciduais sob condições inflamatórias, principalmente, pela capacidade desses compostos em reagir rapidamente com dióxido de nitrogênio e com radical carbonato. Neste processo, os nitróxidos são oxidados em seu cátion oxoamônio correspondente que, por sua vez, podem ser reciclados de volta para os nitróxidos, reagindo com espécies montantes como peroxinitritos e peróxido

de hidrogênio, ou ainda, com redutores celulares. Nesse estudo de revisão, considera-se ainda que um mecanismo de proteção auxiliar envolve a regulação negativa da expressão de óxido nítrico sintase induzida (Augusto et al., 2008). Bonini, Mason e Augusto (2002) concluíram que a formação de peroxinitrito e seus radicais derivados contribuem para a lesão dos tecidos em condições inflamatórias e, portanto, os efeitos protetores do tempol contra lesões associadas à uma superprodução de óxido nítrico podem ser atribuídos à sua atividade mimética à superóxido dismutase, prevenindo a produção de peroxinitrito, levando à catálise de peroxinitrito ou a sua decomposição em trióxido de dinitrogênio.

Isto posto, é importante salientar o potencial terapêutico do tempol, o qual vem sendo testado em diversas doenças, considerando variadas condições, períodos de tratamento e doses (Wilcox, 2010). A literatura apontou efeitos benéficos da administração do tempol, envolvendo órgãos como rins (Penna et al., 2015), coração (Liu et al., 2014), vasos sanguíneos (Polytarchou & Papadimitriou, 2004), cérebro (Hall et al., 2010), medula espinal e nervos periféricos (Spejo et al., 2019), retina (Zhou et al., 2008), cóclea (Minani et al., 2007), fígado (Wei et al., 2009), trato gastrointestinal (Rachmilewitz et al., 1994), pulmão (Cuzzocrea et al., 2004; Silva et al., 2020), músculo esquelético (Hermes et al., 2019), pele (Greenwald et al., 2015), dentre outros (Wilcox, 2010). Dentre suas vantagens de utilização, é importante ressaltar que a capacidade dos nitróxidos de proteção contra radiação é notável (Soule et al., 2007) e uma das aplicações mais estudadas até o momento, que já indicou resultados de proteção em seres humanos (Metz et al., 2004). Na radioterapia, o tempol apresentou efeito protetor à radiação e à luz ultravioleta *in vivo* e *in vitro* (Hahn et al., 1992a; 1992b). Na experimentação animal, o tempol demonstrou proteção contra o dano tecidual induzido por radiação nas glândulas salivares (Cotrim et al., 2005) e diminuiu a incidência de mucosite oral (Hu et al., 2017). Estudos recentes trazem ainda a ação do tempol sobre o metabolismo energético das células, sendo grande a sua influência sobre o processo de biogênese mitocondrial (Silva et al., 2021).

Dessa forma, estudos tem demonstrado também o papel desse nitróxido no tratamento de diversos tipos de câncer, principalmente como estratégia de tratamento coadjuvante. Recentemente, Ewees e colaboradores (2018) verificaram que o tempol, utilizado como tratamento conjunto à Cisplatina, diminuiu a nefrotoxicidade desse tratamento e que esse efeito protetor foi dose-dependente. Tal efeito foi importante, visto a grande toxicidade da cisplatina para os rins, após a sua metabolização. Também, efeitos do tempol apontaram a prevenção e amenização da hiperalgesia em modelos animais de dor neuropática induzida por quimioterapia (Kim, Hwang & Abdi, 2017). Muitos efeitos diretos do tempol sobre a progressão tumoral também foram reportados. Li et al. (2017) observaram que o tempol suprimiu a produção de

espécies reativas de nitrogênio, levando a significativa diminuição de lesões no DNA e ao atraso no início do câncer de pâncreas em modelo murino induzido de câncer de pâncreas. Chen et al. (2015) concluíram que a terapia com tempol auxiliou na prevenção de hipóxia cíclica induzida por Temozolamida em modelo animal de glioblastoma. Esse mesmo estudo apontou que a terapia associada de Temozolamida e tempol suprimiu o crescimento tumoral e aumentou a taxa de sobrevivência nos camundongos portadores de glioblastoma. Badia et al. (2016) evidenciaram a ação antiproliferativa exercida pela adição de tempol ao meio de cultura celular de duas linhagens de células de câncer de mama (MCF7L-ICILT e MCF7L-OHTLT). Recentemente, Ye e colaboradores (2020) demonstraram ação do tempol na supressão da proliferação de células de câncer de ovário, interferindo no processo de metabolismo da glutamina, corroborando com o entendimento do tempol como estratégia terapêutica que pode ser associada a outras drogas anti-câncer. Cada vez mais, estudos recentes vêm explorando a aplicação do tempol em terapias coadjuvantes no câncer, seja por sua aplicação como protetor tecidual (Hu et al., 2017) ou por aplicações teciduais diretas para avaliação da progressão tumoral (Ye et al., 2020), seja ainda para o monitoramento de processos avançados relacionando nanopartículas e células tumorais (Krzyminiewski et al., 2020).

No entanto, apesar de diferentes aplicações no câncer, a avaliação dos efeitos do tempol especificamente para próstata é escassa e controversa na literatura. Thomas & Sharifi (2012) verificaram efeitos do tempol sobre a função dos receptores de andrógenos (AR) e significativa redução do crescimento de células tumorais prostáticas *in vivo* e *in vitro*. Em contrapartida, estudo realizado por Lejeune e colaboradores (2006) sugeriram que o tempol levou à ativação pós-transcricional *in vitro* do receptor de uroquinase, o que estaria associado à progressão do CaP no humano.

Portanto, somando-se ao conhecimento das aplicações terapêuticas do tempol, do seu papel como potencial antioxidante e inibidor de marcadores inflamatórios, vale salientar que sua utilização no tratamento do câncer se torna, particularmente, interessante quando estudos demonstram que o tempol parece atuar também no processo de formação de novos vasos, apresentando efeitos anti-angiogênicos, mediados principalmente pela consequente redução na geração de óxido nítrico induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, após seu uso, em tecidos ou modelos celulares (Polytarchou & Papadimitriou, 2004).

### **1.5. MiRNAs e câncer de próstata**

Os microRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA não codificante de tamanho reduzido que têm um amplo impacto na função celular e fisiológica de organismos multicelulares. Com

cerca de 21 a 23 nucleotídeos, eles regulam a tradução de RNAs específicos ao se ligarem a sequências reguladoras complementares do RNA, o que pode resultar na degradação ou desestabilização do mRNA. Em humanos, existem aproximadamente 5000 tipos diferentes de miRNAs, e cada um deles pode se ligar a cerca de 200 mRNAs em média (Gaudet et al., 2017). Isso sugere que esses pequenos RNAs podem funcionar como "mestres reguladores" da atividade celular, o que tem despertado grande interesse na última década (Miranda et al., 2010). A descoberta dos miRNAs e outros RNAs não codificantes é relativamente recente (Bartel, 2004), e, como resultado, seu papel funcional no câncer ainda não está totalmente elucidado. No entanto, há evidências de que eles desempenham um papel importante na incidência e progressão do câncer. No contexto do Câncer de Próstata (CaP), diversos miRNAs estão associados à progressão tumoral, incluindo a transição do câncer de uma forma dependente de andrógenos para uma forma independente de andrógenos. O perfil de expressão desses miRNAs no CaP tem sido alvo de uma investigação crescente, devido ao seu potencial diagnóstico, marcador de estadiamento, prognóstico e avaliação da resposta a tratamentos médicos (Xiaoli et al., 2015).

Assim, a expressão aberrante de miRNAs, podendo estar aumentada ou diminuída, é reconhecida por interromper ou perturbar a expressão de diversos mRNAs e proteínas, processo que pode estar envolvido com a patogênese de diversos cânceres. Xiaoli e colaboradores (2015) mostraram que um total de 162 miRNAs foram encontrados sendo expressos de maneira distinta entre amostras de próstata saudável e amostra de CaP, sendo 128 miRNAs aumentados e 38 suprimidos. Os miRNAs *hsa-miR-153-2*, *hsa-miR-92a-1*, *hsa-miR-182* (aumentados) e *hsa-miR-29a*, *hsa-miR-10a*, *hsa-miR-221* (diminuídos) foram eleitos como biomarcadores confiáveis para prognóstico do CaP. Recentemente, Hu et al. (2019) demonstraram o efeito de um medicamento chinês a base de ervas, a icaritina, na modulação do oncogene UBE2C através da regulação do *miR-381-3p* no modelo TRAMP, sendo um dos poucos estudos nesse modelo, identificando a regulação de um miR após um tratamento. Segundo D'Souza et al. (2020), em recente artigo de revisão, apontaram o papel central dos RNA's não codificantes, dentre eles os miRNAs, no entendimento do processo de carcinogênese relacionando-se às espécies reativas de oxigênio e a importantes moléculas de sinalização de processos celulares, como o Nrf2 e o NFκB.

## 2. JUSTIFICATIVA

O presente estudo teve como foco principal investigar as possíveis alterações decorrentes da administração do tempol (4-hidroxi-TEMPO) na atividade proliferativa das células prostáticas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, caracterizando sua ação na progressão do câncer de próstata através da análise de processos fundamentais na carcinogênese, como a inflamação e o estresse oxidativo. Estudos detalhados que abordem diferentes fármacos, já utilizados ou não, que possam levar ao atraso da progressão do adenocarcinoma de próstata são cruciais, se considerando a complexidade do desenvolvimento e progressão desse tipo de lesão tecidual, além da elevada incidência dessa doença na população mundial.

Na literatura, o tempol, que é um sintético sobretudo antioxidante, já tem apresentado aplicações pré-clínicas como coadjuvante no tratamento de diferentes tipos de câncer. Contudo, ainda não estão estabelecidas as diferentes respostas celulares e moleculares do microambiente da próstata com o uso do tempol, tanto na atividade proliferativa das células prostáticas, quanto no processo inflamatório bem como seus possíveis mecanismos de ação. Além disso, a resposta diferencial do microambiente prostático se considerando o grau de agressividade da doença, o perfil de dependência hormonal do tumor ou o período de administração dessa droga também são pontos ainda não evidenciados.

Assim, os esforços para se entender a ação do tempol no microambiente tumoral da próstata, propostos no presente estudo, são importantes e trarão sólida contribuição para o tratamento desse tipo de câncer, o qual tem diferentes variáveis, se considerando a dependência hormonal desse órgão, o CaP refratário às terapias hormonais, além de sua incidência prioritária em idosos, período assinalado pelo desequilíbrio de fatores inflamatórios e oxidativos no organismo.

Há escassez de informações sobre o perfil de expressão de miRNAs no lobo ventral e dorsolateral do modelo TRAMP, sendo raros os estudos que verificam a modificação na expressão dos miRNAs nesse modelo transgênico em resposta a um tratamento. Assim, essa é uma questão de interesse visto que alterações da expressão desses pequenos marcadores podem ter grande impacto na progressão da lesão tecidual, bem como ser promissores indicadores de progressão e prognóstico do CaP.



### 3. OBJETIVO GERAL DA TESE

O presente estudo teve como objetivo caracterizar a resposta proliferativa, inflamatória, oxidante e o perfil de expressão de miRNAs no microambiente do adenocarcinoma de próstata frente ao tratamento com o tempol, em diferentes doses e em diferentes estágios de progressão do câncer, tanto *in vivo* no modelo TRAMP, transgênico para adenocarcinoma de próstata quanto *in vitro*, para as linhagens tumorais humanas PC-3 e LNCaP, considerando-se a independência e dependência androgênica dessas células.

#### 3.1. Objetivos específicos

I. Descrever a histopatologia do lobo ventral da próstata de camundongos TRAMP, destacando a ocorrência ou não neoplasia intraepitelial prostática (NIP) e adenocarcinoma de próstata nos diferentes grupos experimentais, com e sem tratamento com tempol, considerando diferentes dosagens.

II. Imunolocalizar e quantificar os níveis proteicos de moléculas relacionadas ao processo inflamatório, em especial à via de ativação do NFκB, no lobo ventral da próstata dos diferentes grupos experimentais no modelo TRAMP com e sem tratamento com tempol, considerando diferentes dosagens.

III. Quantificar os níveis proteicos de moléculas relacionadas a resposta oxidativa da próstata, a sobrevivência celular e a processos relacionados a biogênese mitocondrial no lobo ventral da próstata dos diferentes grupos experimentais no modelo TRAMP com e sem tratamento com tempol, considerando diferentes dosagens.

IV. Analisar, *in vitro*, a viabilidade e resposta de duas linhagens celulares frente a ação de diferentes doses de tempol e diferentes tempos de tratamentos, sendo uma andrógeno-dependente (LNCaP) e uma andrógeno-independente (PC3).

V. Quantificar os níveis protéicos de moléculas relacionadas ao processo inflamatório, em especial à via de ativação do NFκB, nas linhagens celulares tumorais PC-3 e LNCaP com e sem tratamento com tempol.

VI. Quantificar os níveis protéicos de moléculas relacionadas a resposta oxidativa da próstata, a sobrevivência celular e a processos relacionados a biogênese mitocondrial nas linhagens celulares PC-3 e LNCaP com e sem tratamento com tempol.

VII. Estabelecer uma correlação entre a presença de processos inflamatórios e as modificações nas próstatas por meio de abordagens moleculares e técnicas distintas, examinando os efeitos preventivos ou não do tratamento com tempol em linhagens celulares

humanas (PC3 e LNCaP) e em camundongos TRAMP em diferentes estágios de avanço da lesão prostática.

VIII. Quantificar a expressão gênica dos marcadores inflamatórios escolhidos tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

IX. Predizer bioinformaticamente miRNAs que atuem na via inflamatória com base nos genes alvos eleitos.

X. Quantificar a expressão de miRNAs presentes no lobo ventral e no plasam dos camundongos TRAMP e para as linhagens celulares LNCaP e PC3, verificando o comportamento dessas expressões frente ao tratamento com tempol.

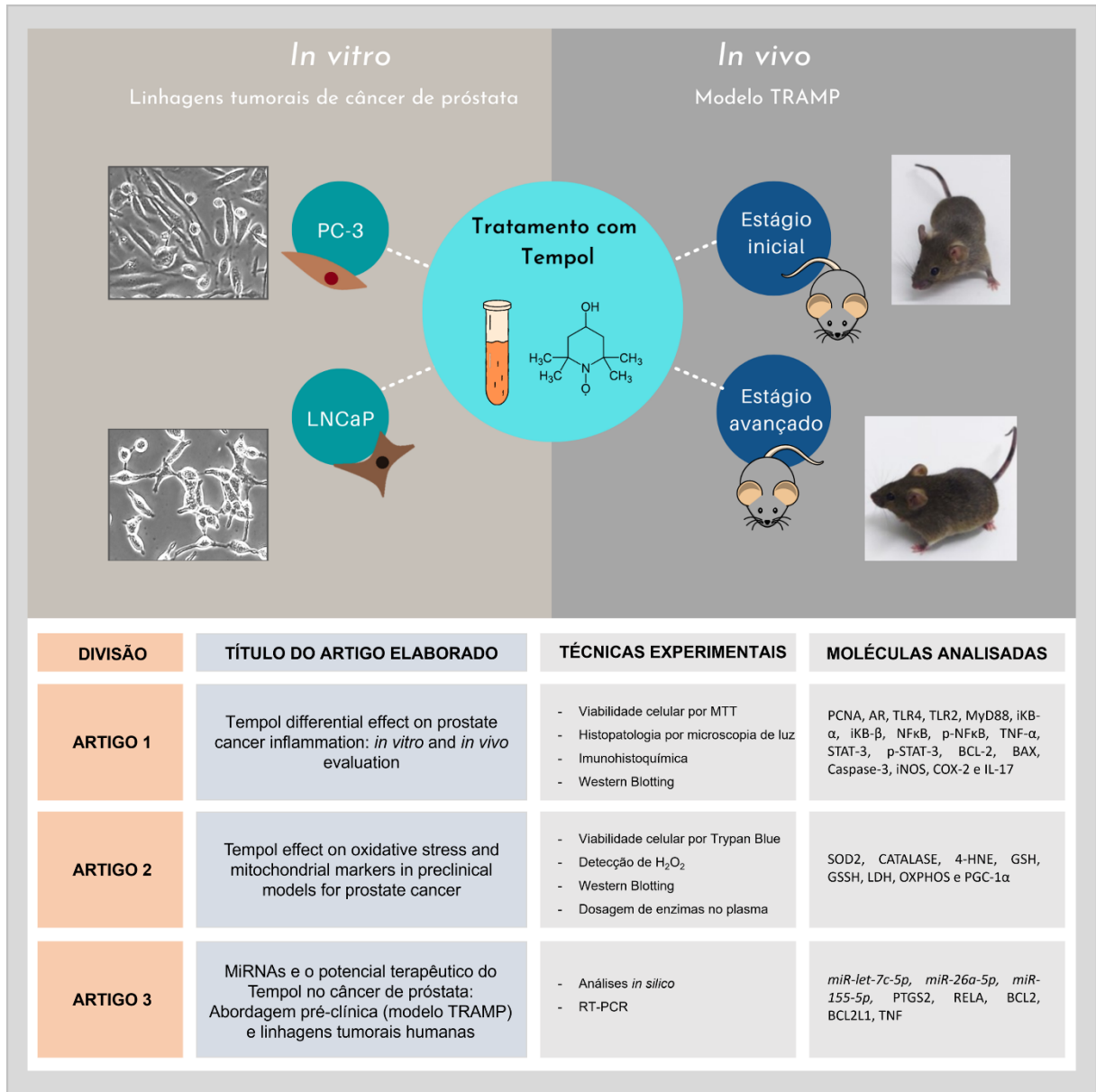
#### 4. ESTRUTURA DA APRESENTAÇÃO DA TESE

A tese de doutorado apresentada aqui foi elaborada, reunindo os resultados em três artigos científicos (Figura 3). A metodologia geral da tese será apresentada em português, para que todos os detalhes metodológicos possam ser explicados, facilitando assim a reprodutibilidade experimental.

O primeiro artigo científico foi publicado no periódico *The Prostate*. Reuniu os experimentos exploratórios iniciais com tempol sobre as linhagens celulares PC-3 e LNCaP e demonstrou alterações de importantes marcadores inflamatórios e sobrevivência celular após o tratamento com tempol nessas células. Também neste artigo, avaliações *in vivo* investigaram pioneiramente os efeitos do tempol no modelo TRAMP, abordando aspectos morfológicos e marcadores inflamatórios e de sobrevivência celular no lobo ventral desses animais no estágio inicial e avançado da progressão do câncer de próstata.

O segundo artigo científico foi submetido para publicação no periódico *International Journal of Experimental Pathology*, e encontra-se em fase de revisão. Teve como foco reportar a resposta oxidativa das linhagens celulares PC-3 e LNCaP e do modelo TRAMP frente ao tratamento com o tempol. Além disso, para o modelo TRAMP, explorou-se aspectos do comportamento mitocondrial, sugerindo pela primeira vez nesse modelo alterações no metabolismo energético e na fosforilação oxidativa frente ao tempol.

O terceiro artigo científico está em fase de submissão à revista *Life Sciences* e reuniu os resultados moleculares das expressões gênicas de alvos e miRNAs relacionados à via inflamatória do NFκB no modelo TRAMP e nas linhagens tumorais humanas PC-3 e LNCaP. Esse trabalho é inteiramente inédito uma vez que não há na literatura nenhum trabalho que demonstre o tempol agindo sobre a expressão de miRNAs teciduais e sistêmicos relacionados à inflamação. Como ainda está em fase de elaboração, os resultados e a discussão deste artigo foram apresentados em português na presente tese.



**Figura 3.** Figura esquemática da estruturação da presente tese. Metade inferior da imagem: ilustração da divisão em artigos e o conteúdo experimental de cada um deles.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS GERAIS DA TESE

### 5.1. Análises *in vitro*: Cultura de células tumorais prostáticas

Células tumorais das linhagens PC-3 (ATCC CRL-1435) e LNCaP (ATCC CRL-1740) foram cultivadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade em RPMI-1640 Medium (ATCC 30-2001), contendo L-glutamina com soro fetal bovino (SFB) a 10% (*Gibco®*, *Life Technologies Inc.*, *Grand Island, EUA*), 25 U/mL de penicilina/streptomicina (*Life Technologies Inc.*, *Grand Island, EUA*). O meio de cultura foi substituído a cada 2 ou 3 dias e todos os experimentos foram realizados com células apresentando entre 60 e 80% de confluência:

**a. Grupo PC3 Controle (PC3-C):** culturas de células PC3- mantidas em meio de cultura por 24, 48 ou 72 horas.

**b. Grupo PC3 + tempol (PC3-TPL):** culturas de células PC3 tratadas por 24, 48 ou 72 com tempol adicionado ao meio de cultura em concentrações gradativas.

**c. Grupo LNCaP Controle (LNCaP-C):** culturas de células LNCaP- mantidas em meio de cultura por 24, 48 ou 72 horas.

**d. Grupo LNCaP + tempol (LNCaP-TPL):** culturas de células LNCaP tratadas por 24, 48 ou 72 com tempol adicionado ao meio de cultura em concentrações gradativas.

#### 5.1.1. Análise da viabilidade celular pela técnica de MTT

O teste de viabilidade celular foi realizado com base na redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio, REF M5655, *Sigma-Aldrich*, *St. Louis, EUA*), um sal amarelo solúvel em água. Esse processo ocorre devido à atividade metabólica celular, que está associada aos coenzimas NADH e NADPH, formando cristais insolúveis de formazan de coloração azul ou roxa. A intensidade da coloração azul ou roxa serve como um indicador da viabilidade das células: quanto maior a leitura de absorbância a 570 nm, maior é a viabilidade das células no poço. Em geral, esse ensaio está também ligado à mensuração da atividade mitocondrial, sendo mediado pelo funcionamento da enzima desidrogenase mitocondrial.

A seguintes doses foram propostas para avaliação da citotoxicidade do tempol, em ambas as linhagens celulares: 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 e 10.0 mM de tempol, diluído no meio de cultura RPMI 1640. Os tempos de ação da droga foram analisados em 24, 48 e 72h. As células foram incubadas em placas de 96 poços, contendo todos o mesmo número de células ( $1 \times 10^4$  para PC-3;  $1.5 \times 10^4$  para LnCaP) e tratadas com as doses escolhidas 24 horas após o plaqueamento. No momento da análise, o meio de cultura foi removido e o reagente MTT (diluído em meio RPMI sem Soro Fetal Bovino e sem Fenol, na proporção de 1mg/ml) foi acrescentado a cada um dos poços. O tempo de incubação do experimento foi de 40 minutos e

a revelação foi realizada com DMSO. A placa foi lida no comprimento de onda de 570nm. Cada experimento foi realizado no mínimo três vezes, com três passagens celulares distintas para cada linhagem celular, a fim de se confirmar a tendência observada para cada dose.

Para o cálculo da significância estatística, os valores de absorbância foram considerados normais pelo Teste de Shapiro-Wilk e o teste ANOVA-One-Way foi realizado, seguido do pós-teste de Dunnett. O intervalo de confiança considerado foi de  $p < 0,95$ .

### **5.1.2. IC<sub>50</sub> e escolha de dose para tratamento**

A dose de IC<sub>50</sub> representa a dose responsável pela inibição de 50% do crescimento celular para o tempo de exposição analisado. Para o cálculo do IC<sub>50</sub>, os valores obtidos pelo ensaio de MTT foram utilizados. Os valores de dose testados (eixo X) foram transformados usando  $X = \log[X]$ . Os dados foram normalizados considerando Y=0 igual a 0%, e a maior média em cada um dos *data sets* como 100%. Em seguida, foi calculada a regressão não-linear dos dados através da equação escolhida:  $\log[\text{tempo}]$  vs. Resposta normalizada (inclinação variável). Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando-se do Software GraphPad Prism 7.0.

Para enquadrar um importante efeito biológico de redução da proliferação celular e uma melhor relação dose de tratamento versus tempo de exposição, dois critérios foram adotados para a escolha da dose tanto para PC-3 quanto para LNCaP: (1) Significância estatística pelo teste ANOVA-One-Way, pós-teste Dunnett; e (2) dose menor que a apontada pelo valor de IC<sub>50</sub>. A menor dose a se cumprir ambos os critérios nas linhagens celulares foi encontrada em 48h de exposição ao tempol, sendo a dose de 1mM para PC-3 e 2mM para LNCaP (ver resultados MTT). Para entender os efeitos dessa mesma dose em um maior tempo de exposição, os experimentos foram também realizados para 72 horas de exposição.

### **5.1.3. Análise da viabilidade celular pela técnica de Trypan Blue**

A fim de se confirmar a diminuição da viabilidade celular após o tratamento com o tempol utilizando-se de outra técnica, o teste de Trypan Blue foi executado para as linhagens PC-3 e LNCaP. As células foram incubadas em placas de 12 poços, contendo todos o mesmo número conhecido de células ( $3 \times 10^4$  para PC-3;  $5 \times 10^4$  para LNCaP) e tratadas com as doses escolhidas 24 horas após o plaqueamento. Com base na análise prévia de MTT, três doses de tratamento foram consideradas adequadas, sendo elas 2.0mM, 1.0mM e 0.5mM em três tempos distintos de tratamento (24, 48 e 72h).

No momento da análise, raspagem e coleta do conteúdo celular presente nos poços da placa de cultura foram realizados. O conteúdo coletado no tubo de ensaio foi centrifugado a

1600rpm durante 5 minutos. O pellet de células foi mais uma vez lavado em DPBS e transferido para um microtubo, sendo posteriormente centrifugado pela segunda vez a 10000rpm, durante 15 min. O conteúdo foi, então, suspenso em 100µl de uma solução de 0,1% de Trypan Blue (REF T8154, *Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*).

A mistura foi agitada e deixada em repouso por cerca de 3 a 5 minutos. Uma alíquota de 10 µl desta mistura foi aplicada a câmara de Neubauer e observada ao microscópio invertido sob o aumento de 10x. A seguir, células viáveis foram contadas. Cada experimento foi realizado em triplicata para cada uma das doses analisadas, sendo realizado no mínimo três vezes, com três passagens celulares distintas para cada linhagem celular, a fim de se confirmar a tendência observada para cada dose.

Para o cálculo da significância estatística, os valores de contagem celular foram considerados normais pelo Teste de Shapiro-Wilk e o teste ANOVA-One-Way foi realizado, seguido do pós-teste de Dunnett. O intervalo de confiança considerado foi de  $p < 0,95$ .

#### **5.1.4. Western Blotting para cultura celular**

As células PC-3 e LNCaP foram cultivadas em placas de Petri e submetidas a tratamento ou mantidas sem tratamento 24 horas após o processo de semeadura, usando a dose específica de tempo escolhida para cada linhagem. Após 48 horas e 72 horas de exposição, as células foram coletadas e congeladas em biofreezer (-20°C) ou processadas imediatamente. A lise das amostras foi realizada utilizando um tampão de extração não desnaturante (Tampão de Lise: NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, 1% Triton, 0,1% SDS, pH 8,00), suplementado com 1% de aprotinina de pulmão bovino (REF A6279, *Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*). As amostras foram homogeneizadas por meio de um sonicador ultrassônico SONICS VibraCells™ (*Sonics & Material, Inc., EUA*), e os extratos teciduais foram obtidos por centrifugação a 15000 rpm por 20 minutos a 4°C. Alguns microlitros de cada amostra foram utilizados para mensurar a concentração de proteínas do tecido, através da quantificação pelo reagente Bradford (*Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA*).

As amostras foram misturadas em proporção 1:1 com tampão de amostra *2X Laemmli Sample Buffer* (*Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA*) contendo 5% de β-mercaptanol, e então incubadas em banho seco a 95°C por 5 minutos. O volume de amostra correspondente a 50 microgramas de proteínas foi aplicado em gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido para membranas de nitrocelulose usando o Sistema Hoefer a 120 V por 90 minutos. As membranas foram subsequentemente bloqueadas com BSA 3% diluído em

TBS-T por uma hora, e em seguida, foram incubadas com os anticorpos primários (mais detalhes são fornecidos na metodologia de cada artigo científico).

Os anticorpos primários foram diluídos em uma faixa que variou de 1:250 a 1:1000 (as informações detalhadas sobre os anticorpos podem ser encontradas no material suplementar dos respectivos artigos em que foram analisados). Após lavagem com solução basal, as membranas foram incubadas por 2 horas com anticorpos secundários anti-rabbit ou anti-mouse conjugados com HRP, na diluição de 1:1000-5000 em leite ou BSA 1%. A detecção foi realizada utilizando uma solução quimioluminescente (*Super Signal West Pico Chemiluminescent/Thermo Scientific/34080*). As bandas resultantes foram capturadas por meio do equipamento G-BOX e da chemicamera (*Syngene, Cambridge, Reino Unido*).

Para as duas linhagens celulares, a densitometria dos pixels das bandas marcadas foi calculada através do Programa Uni-Scan-It 6.1. Os valores obtidos foram processados através do programa GraphPad Prism 7.0. Os dados foram considerados normais através do teste de Shapiro-Wilk e foi empregado o Teste T de Student para as comparações entre os seguintes pares de grupos:

- Grupo Controle 48h (C-48h, grupo que recebeu RPMI puro após o plaqueamento) e Grupo tempol 48h (T-48h, grupo que recebeu RPMI+tempol após o plaqueamento);
- Grupo Controle 72h (C-72h, grupo que recebeu RPMI puro após o plaqueamento) e Grupo tempol 72h (T-48h, grupo que recebeu RPMI+tempol após o plaqueamento).

Todos os experimentos de Western Blotting foram realizados com, no mínimo, três passagens de PC-3 e LNCaP tratadas e devidamente processadas, sendo realizado em triplicate técnica e biológica. O marcador  $\beta$ -actina foi utilizado como controle endógeno.

#### **5.1.5. Detecção *in vitro* de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

O ensaio empregou o kit Amplex® Red (*Molecular Probes, Life Technologies, Califórnia, EUA*) para quantificar os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguindo as orientações do fabricante. As células foram mantidas a 37°C em solução de Krebs Ringer e incubadas com a sonda Amplex Red (50  $\mu$ M) e peroxidase horseradish (0,1 U/mL) durante 30 minutos. Posteriormente, 100  $\mu$ L do meio foram colhidos e a intensidade da fluorescência foi mensurada com excitação a 530 nm e emissão a 590 nm, utilizando um leitor de microplacas *Multi-Mode modelo Sinergy HIM (Bio-Tek Instruments)*. Como parte do protocolo, controles positivos e negativos foram preparados. Para o controle positivo, empregaram-se 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em solução tampão, enquanto o controle negativo consistiu apenas na solução tampão. O experimento foi replicado em triplicata tanto em termos técnicos quanto biológicos.



## 5.2. Análises *in vivo*: Animais e procedimento experimental

O presente estudo utilizou-se de 50 camundongos transgênicos (*Mus musculus*), machos, da linhagem TRAMP (C57BL/6-Tg(TRAMP)8247Ng/J X FVB/NJ)F1/J), obtidos junto ao Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Esses camundongos TRAMP foram adquiridos por meio do projeto Fapesp 2010/51112-5, sendo a colônia estabelecida na UNICAMP. Durante o experimento, os animais tiveram acesso irrestrito a ração e água (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil), ficando alojados no Instituto de Biologia, no Biotério do Departamento de Biologia Celular e Estrutural (Área de Anatomia), até que atingissem a idade adequada para os tratamentos experimentais correspondentes.

Os camundongos da linhagem TRAMP foram divididos em diferentes conjuntos, consistindo em dois grupos destinados à avaliação da fase inicial da doença (CT12 e TPL12), e três grupos destinados à investigação das etapas mais avançadas das lesões, incluindo a análise de uma segunda dose de tratamento (CT20, TPL20-I, TPL20-II):

**Grupo CT12 (8 a 12 semanas):** 15 camundongos TRAMP com idade de 8 semanas. Receberam gavagem de água potável (veículo de diluição do tempol), ração padrão para camundongos e água *ad libitum* até a 12<sup>a</sup> semana.

**Grupo TPL12 (8 a 12 semanas):** 15 camundongos TRAMP com idade de 8 semanas. Receberam gavagem de tempol (50 mg/Kg) diluído em água potável, cinco vezes por semana (uma dose diária), ração padrão para camundongos e água *ad libitum* até a 12<sup>a</sup> semana.

**Grupo CT20 (16 a 20 semanas):** 15 camundongos TRAMP com idade de 16 semanas. Receberam gavagem de água potável (veículo de diluição do tempol), ração padrão para camundongos e água *ad libitum* até a 20<sup>a</sup> semana.

**Grupo TPL20-I (16 a 20 semanas):** 15 camundongos TRAMP com idade de 16 semanas. Receberam gavagem de tempol (50 mg/Kg) diluído em água potável, cinco vezes por semana (uma dose diária), ração padrão para camundongos e água *ad libitum* até a 20<sup>a</sup> semana.

**Grupo TPL20-II (16 a 20 semanas):** 15 camundongos TRAMP com idade de 16 semanas. Receberam tempol (100 mg/Kg) diluído em água potável, cinco vezes por semana (uma dose diária), ração padrão para camundongos e água *ad libitum* até a 20<sup>a</sup> semana.

A dose e o tempo de tratamento foram escolhidos com base em estudos que se utilizaram do tempol em modelos *in vivo* (Thomas & Sharifi, 2012; Chiarotto et al., 2019). Depois de escolhida as doses de 50 e 100 mg/Kg, realizou-se um experimento piloto que constatou efeito biológico interessante e factível de ser investigado.

Os animais foram tratados com tempol (4-Hidroxi-TEMPO, 97%, REF 176141, *Sigma-Aldrich*) na dose de 50mg/Kg ou 100mg/Kg. Após as 4 semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados. O experimento foi realizado de acordo com o estabelecido para uso de animais experimentais pelo comitê de ética (CEUA:5115-1/2019,5115-1(A)-2020). Os lobo ventrais da próstata foram coletados e processados para as diferentes análises.

### **5.2.1. Análises histopatológicas por microscopia de luz**

Amostras do lobo ventral da próstata, obtidas de 5 animais pertencentes a cada grupo experimental, foram coletadas e fixadas na solução de Bouin. Posteriormente, as amostras foram submetidas a lavagens em álcool etílico a 70% e passaram por uma série gradual de desidratação utilizando álcoois crescentes. Os fragmentos foram tornados translúcidos em xilol por um período de 2 horas e então emblocados em parafina ultrafiltrada contendo polímeros plásticos (*Paraplast Plus, St. Louis, EUA*).

Em seguida, as amostras da próstata foram seccionadas no micrótomo Hyrax M60 (Zeiss, Munique, Alemanha), produzindo seções com uma espessura de 5 µm. As lâminas histológicas resultantes foram coradas com Hematoxilina-Eosina (conforme Junqueira et al., 2013) e posteriormente foram capturadas em imagens utilizando o fotomicroscópio Nikon Eclipse E-400 (*Nikon, Tóquio, Japão*).

A análise histopatológica do tecido prostático foi feita através da captura de 10 fotomicrografias (Objetiva de 40X) de cada lobo, por animal de cada grupo, obtidas aleatoriamente no tecido. Cada uma dessas imagens foi dividida em quatro quadrantes. Para cada quadrante, observou-se a ocorrência de: epitélio saudável (ES), neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau (NIP-), neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (NIP+) e adenocarcinoma bem-diferenciado (AD), de acordo com a presença das lesões observadas (descritas na tabela 1). Ao final foram totalizados 200 quadrantes analisados por grupo. Para cada observação morfológica do tecido prostático foi obtido um valor de frequência relativa dividindo-se o número de observações de uma determinada característica morfológica (EN, NIP+, NIP-, AD) pelo número total de características morfológicas observadas para cada animal analisado. A média dessas frequências relativas levou ao escore do grupo para cada uma das características morfológicas analisadas. O protocolo de análise utilizado para análise morfológica foi modificado de Berman-Booty et al. (2012), Gingrich et al. (1999), Kido et al. (2016) e Silva et al. (2017).

Os animais que apresentaram tumor palpável, visível a olho nu após a dissecação ou ainda visível através da lente de aumento foram contabilizados e o local de incidência do tumor foi

reportado (se lobo ventral, dorsolateral e/ou glândula de coagulação). Esses dados foram traduzidos em porcentagem da incidência e distribuição dos tumores.

### **5.2.2. Contagem de Células PCNA- Positivas para o Índice Proliferativo**

Amostras do lobo ventral de 5 animais de cada grupo foram coletadas (mesmos animais utilizados para histopatologia) e submetidas a análise de imunohistoquímica. Imunomarcção do antígeno PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) foi obtida através do anticorpo monoclonal mouse (SC65598, Santa Cruz Biotchnology, USA). A descrição da imunomarcção para o PCNA encontra-se no item 5.2.3. Dez fotomicrografias por animal foram obtidas e a cada uma delas foi sobreposta uma grade de 400 pontos de intersecção.

As intersecções da grade foram consideradas pontos positivos quando localizadas sobre uma região da imagem positiva para PCNA. Para a determinação do índice proliferativo de cada imagem, dividiu-se o número de pontos positivos pelo número total de pontos da grade. A média de cada grupo foi composta pela média da frequência relativa de PCNA para cada animal.

### **5.2.3. Imunohistoquímica de antígenos**

Amostras do lobo ventral da próstata de 5 animais de cada grupo foram submetidas a marcações de antígenos de interesse. Os cortes, com uma espessura de 5 µm, foram obtidos utilizando o micrótomo Hyrax M60 (*Zeiss, Munique, Alemanha*) e colocados em lâminas previamente silanizadas. Para a recuperação antigênica, os cortes foram submetidos a incubação em tampão citrato a cerca de 100°C (aquecimento através de micro-ondas) ou foram incubados com proteinase K, conforme apropriado para cada anticorpo específico.

As peroxidases endógenas foram bloqueadas utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3% em metanol), seguido por incubação em solução de BSA a 1-3%, siluído em tampão TBS-T, por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, os antígenos foram identificados por meio de anticorpos cujas especificações estão disponíveis no material suplementar dos respectivos artigos nos quais foram analisados. Esses anticorpos foram diluídos (1:35-500) em BSA a 1% e foram armazenados durante a noite a 4°C.

A detecção dos antígenos foi realizada utilizando o kit Envision HRP (*Dako Inc., EUA*), seguindo as instruções do fabricante. Depois disso, ocorreu lavagem em solução basal e os cortes foram incubados com o anticorpo secundário HRP conjugado proveniente do kit Envision por 40 minutos. Posteriormente, revelou-se a imunomarcção através de diaminobenzidina (DAB). As amostras foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris e avaliadas utilizando o fotomicroscópio Nikon Eclipse E-400 (Nikon, Tóquio, Japão), utilizando uma objetiva de 40X.

Os antígenos TLR4, iNOS, COX-2 e IL-17 (mais informações sobre os anticorpos encontram-se no artigo científico) foram imunolocalizadas no lobo ventral dos camundongos TRAMP.

#### **5.2.4. Extração de proteínas e Western Blotting**

Amostras do lobo ventral da próstata foram colhidas de 5 animais pertencentes a cada grupo experimental e submetidas a um processo metodológico idêntico ao descrito para o processamento das amostras *in vitro*, conforme mencionado na seção 5.1.4., tanto para extração proteica quanto para execução da técnica de Western Blotting.

A densitometria dos pixels das bandas marcadas foi calculada utilizando o software Uni-Scan-It 6.1. Os valores obtidos passaram por processamento posterior utilizando o programa GraphPad Prism 7.0.

#### **5.2.5. Dosagens plasmáticas**

##### **LDH**

O kit comercial Labtest foi utilizado para a estimativa dos níveis de LDH presentes no plasma sanguíneo dos animais. Através de um sistema cinético, a interconversão de piruvato e lactato, catalisada por LDH na presença de NADH, foi medida com base na redução da absorvância em 340nm (leitor de espectrômetro *Synergy TM 2, BioTek® Instruments, Inc.*, EUA acoplado ao software Gen5™ 2,0), proporcional à atividade de LDH na amostra. Os resultados foram expressos em U/L.

##### **Catalase**

A atividade da Catalase foi determinada seguindo o protocolo de Hadwan & Abed (2016) (adaptado para microplaca). A densidade óptica foi medida em 374 nm em um leitor (*Synergy TM 2, BioTek® Instruments, Inc., EUA*), acoplado ao software Gen5™ 2.0. A medida da atividade de CAT foi expressa em kU.

##### **Superóxido Dismutase**

A atividade SOD total foi realizada pelo método colorimétrico utilizando kit comercial da Elabscience. Em um sistema xantina e xantina oxidase, o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) produziu óxido hidroxilamina para formar nitrito (fator cromogênico). O teor de SOD foi medido com base na capacidade de efeito inibitório sobre  $O_2^-$ . A absorvância foi medida espectrofotometricamente a 550 nm (leitor espectrômetro *Synergy TM 2, BioTek® Instruments, Inc., EUA* acoplado ao software Gen5™ 2.0) e os resultados foram expressos em U/mL.

## GSH/GSSH

Ambas as formas de glutathiona, reduzida e oxidada, foram determinadas de acordo com Rahman et al., 2006. Com base na reação de GSH com 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) que resulta em 5'- ácido tio-2-nitrobenzóico (TNB) e aduto glutathiona-TNB oxidado (GS-TNB). A reação foi realizada em microplaca de 96 poços e medida espectrofotometricamente a 412 nm (espectrômetro leitor *Synergy TM 2, BioTek® Instruments, Inc., EUA* acoplado ao software Gen5™ 2.0). O GSSG foi calculado pela taxa de formação do ácido 2-nitro-5-tiobenzóico em comparação com a curva padrão do GSSG, e o GSH como valores totais de glutathiona – GSSG. Os resultados da taxa de GSH/GSSG foram expressos em  $\mu\text{mol/L}$ .

### 5.2.6. Análises estatísticas para os experimentos *in vivo*

Os dados obtidos em todas as análises *in vivo* foram considerados normais através do teste de Shapiro-Wilk e foi empregado o Teste T de Student para as comparações entre os grupos CT12 e TPL12; e o teste One-Way-ANOVA, com pós-teste de Tukey para os grupos CT20, TPL20-I e TPL20-II.

## 5.3. Análises *in silico*

*Seleção de miRNAs para a validação experimental:* Para a seleção dos miRNAs analisados foram utilizadas duas estratégias: (i) busca na literatura para a seleção de miRNAs sabidamente envolvidos nos processos de inflamação e proliferação celular; (ii) identificação bioinformática de miRNAs que têm como alvos membros-chave da via do NF $\kappa$ B.

*Identificação bioinformática de miRNAs envolvidos na regulação da via desejada:* As listas de genes incluídos na categoria ontológica (GO Terms) “NF $\kappa$ B pathway” foram baixados da plataforma Kegg (kegg.jp). O programa miRWalk Versão 2.0 (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>) foi utilizado para a predição computacional de miRNAs para cada membro das categorias ontológicas de interesse. Os miRNAs que potencialmente regulam membros chave das categorias ontológicas de interesse foram selecionados para análise experimental *in vivo* e *in vitro*.

### 5.3.1. Análise experimental de mRNAs e miRNAs *in vivo* e *in vitro*

*Etapa de extração de RNA total:* O RNA total foi extraído tanto das linhagens celulares quanto das amostras teciduais de acordo com o protocolo descrito Chomczynski et al. (1987), utilizando-se reagente TRIzol (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

*Etapa de transcrição reversa para mRNAs:* Para a síntese do cDNA (DNA complementar) a transcrição reversa foi realizada utilizando-se os reagentes da Thermo Fischer (*Applied Biosystems*). A partir da concentração de RNA na amostra mensurada pelo nanofotômetro Implen P330, calculou-se o volume de amostra necessário para a obtenção de 2µg de RNA. Depois disso, para cada amostra foi acrescentado 1µL de Oligo(dt) (*Exxtend, Brasil*), 1µL de dNTPmix 10mM (*Invitrogen, 18427013*) e o suficiente de H<sub>2</sub>O para a solução atingir 12µL. Essa solução foi incubada a 65°C por 5min, seguido de imediato resfriamento no gelo. Depois disso, foi acrescentado em cada tubo 2µL de 0.1 DTT, 4 µL de 5x first strand buffer, 1 µL de RNaseOUT 40 U/µL (*Invitrogen, 10777-019*) e 1µL de M-MLV Reverse Transcriptase 200U/µL (*Invitrogen, 280225-013*).

Os tubos contendo as amostras e os reagentes citados acima foram incubados em banho seco por 50 min a 42°C, com posterior inativação da reação a 70°C durante 15min.

*Etapa de transcrição reversa para miRNAs:* Para os miRNAs eleitos, a transcrição reversa foi realizada utilizando o kit *Taqman MiRNA Assays* específico para estes. Este kit utiliza-se da síntese dirigida de cDNA para os miRNAs em questão através do método Stem-Loop em que o primer específico para o miRNA promove a formação de um grampo sobre si mesmo, propiciando estabilidade para a transcrição reversa. A fim de otimizar a síntese de cDNA dos miRNAs, utilizou-se o kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*. Para isso, foram utilizados 10ng de RNA total para a síntese, acrescentando-se 1,5µL de tampão 10X, 0,15µL de mix de dNTP (100mM), 0,19µL de inibidor de RNases (20U/µL) e 1µL de transcriptase reversa Multiscribe® (50U/µL), e 3µL de primer específico para os miRNAs eleitos.

Primeiramente, o mix foi preparado e mantido em gelo e depois submetido à variações de temperatura em termociclador Cyclogene (*Techne, Inglaterra*) a 16°C por 30 min, 42°C por 30min, seguida de inativação da transcriptase a 85°C por 5min.

*Etapa de PCR quantitativo em tempo real:* Foram utilizados 5µL do cDNA, 5µL do primer específico para o gene e 10µL de *SYBR Green PCR MasterMix (Thermo Fischer, REF 4309155)* para a quantificação do produto formado durante a reação de PCR para mRNA.

Para a detecção dos produtos formados durante a reação de PCR para os miRNAs, foram usados 1,33µL da síntese de cDNA, 10µL de *TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Thermo Fischer, REF 4440040) (AppliedBiosystems)*, 1µL do mix contendo sonda e primers específicos para os miRNAs escolhidos e 7,67µL de H<sub>2</sub>O destilada e deionizada (ddH<sub>2</sub>O).

As reações foram realizadas em termociclador ABI 7300 Sequence Detection System® (*Applied Biosystems*) nas seguintes condições: 50°C por 2min, 95°C por 10min, e 40 ciclos de

95°C por 15seg e 60°C por 1min. Após o término da reação, a especificidade da reação foi avaliada através da análise da dissociação do produto amplificado. O programa 7300 SDS Software foi utilizado para a análise dos dados obtidos.

*Cálculo da Expressão Gênica Diferencial:* Calculou-se a expressão relativa entre as amostras de acordo com o método descrito por Pfaffl, MW (2001), representadas abaixo. O gene RPL19, que apresentou expressão estável em diferentes condições de tratamento no laboratório, foi escolhido como gene de referência para normalização das reações de qPCR para a análise de mRNA. O miRNA RNU6B (*Thermo Fischer, REF 4427975*) foi utilizado como gene de referência para as amostras de linhagens tumorais humanas. O miRNA U6 snRNA (*Thermo Fischer, REF 001973*).

$$R = \frac{E_f \text{ alvo}^{(Ct \text{ Controle} - Ct \text{ Tratada})}}{E_f \text{ endo}^{(Ct \text{ Controle} - Ct \text{ Tratada})}}$$

As informações e sequência dos primers utilizados na presente tese se encontram descritas detalhadamente na metodologia do artigo científico III.

### 5.3.2. Detecção dos miRNAs no plasma dos camundongos TRAMP

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA e, em seguida, submetidas a uma centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos. A fração de miRNAs foi isolada de todas as amostras através de um kit específico para extração de plasma, o *kit miRNeasy Serum/Plasma (QIAGEN, Hilden, Alemanha)*, seguindo as instruções do fabricante. Para posterior normalização, utilizou-se um sistema de Spike-in (*Spike-in control, REF 219610*), adicionando-se uma quantidade conhecida do miR exógenos *cel-miR-39*, derivado do organismo *C. elegans*, a cada amostra.

O kit *TaqMan microRNA Reverse Transcription (Thermo-Fisher)* foi utilizado para obtenção do cDNA, seguindo as instruções do fabricante. Cerca de 10 ng de RNA extraído das amostras de plasma foram utilizados para a síntese. Nesse processo, adicionamos 1,5 µL de tampão 10X, 0,15 µL de um mix contendo desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) a uma concentração de 100 mM, 0,19 µL de inibidor de RNase (20 U/µL) e 1 µL de transcriptase reversa *Multiscribe®* (50 U/µL), além de 3 µL de um primer específico para o miRNA de interesse e 4,16 µL de ddH<sub>2</sub>O. A reação teve início em ambiente refrigerado e, em seguida, foi submetida a uma temperatura de 16°C por 30 minutos, seguida por uma etapa a 42°C por 30 minutos. A inativação da transcriptase foi realizada a 85°C por 5 minutos utilizando um termociclador *Mastercycler Pro (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha)*.

O cDNA sintetizado foi então empregado na reação de qPCR, conduzida em um termociclador *ABI7500 (Thermo-Fisher)*. Para essa etapa, preparamos uma mistura reacional

contendo 1,33  $\mu\text{L}$  do cDNA sintetizado, 10  $\mu\text{L}$  de *Taqman Universal Master Mix* (Thermo-Fisher), 1,0  $\mu\text{L}$  do ensaio *Taqman MiRNA Assay* (Thermo-Fisher) e 7,67  $\mu\text{L}$  de ddH<sub>2</sub>O. As condições de ciclagem do qPCR incluíram uma etapa inicial a 50°C por 2 minutos, seguida de desnaturação a 95°C por 10 minutos e, posteriormente, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software 7500 SDS.

*Cálculo da Expressão Gênica Diferencial:* Calculou-se a expressão relativa entre as amostras de acordo com o método descrito por Pfaffl, MW (2001), representadas abaixo. O gene RPL19, que apresentou expressão estável em diferentes condições de tratamento no laboratório, foi escolhido como gene de referência para normalização das reações de qPCR para a análise de mRNA. O miRNA RNU6B (Thermo Fischer, REF 4427975) foi utilizado como gene de referência para as amostras de linhagens tumorais humanas. O miRNA U6 snRNA (Thermo Fischer, REF 001973).

$$R = \frac{E_{f \text{ alvo}}^{(Ct \text{ Controle} - Ct \text{ Tratada})}}{E_{f \text{ endo}}^{(Ct \text{ Controle} - Ct \text{ Tratada})}}$$

### 5.3.3. Análise de enriquecimento gênico funcional

A fim de entender quais vias seriam afetadas pelo aumento dos miRNAs decorrentes do tratamento com Tempol, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, foi realizado enriquecimento gênico através de predições bioinformáticas através do software Cytoscape network (Detalhes técnicos: Cytoscape Version: 3.8.2; Database for protein interactions: STRING protein).

Através do miRWalk version 2.0 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>) foram preditas, por 12 algoritmos diferentes, as interações baseadas nas sequências dos alvos dos miRNAs escolhidos. Apenas as interações previstas pelo algoritmo TargetScan e localizadas na região 3'UTR foram consideradas válidas. A partir da lista resultante, criamos uma rede de interações proteína-proteína. Para tal utilizamos a STRING *protein query* no Cytoscape (versão 3.8.2). A pontuação de confiança foi definida como 0,8, 10 interações adicionais foram permitidas e *singletons* não foram considerados. O enriquecimento dessas redes foi realizado utilizando a ferramenta de enriquecimento STRING.



## A. ARTIGO CIENTÍFICO I

Publicado no periódico *The Prostate* 2023 Apr; 83(5):403-415. doi: 10.1002/pros.24473.

Link para o repositório institucional:

<https://hdl.handle.net/20.500.12733/7589>

Link para o repositórios de dados:

<https://redu.unicamp.br/dataset.xhtml?persistentId=doi:10.25824/redu/KBDXHI>

***Tempol differential effect on prostate cancer inflammation: in vitro and in vivo evaluation***

*Running head: Tempol on prostate cancer inflammation*

Isabela, Rossetto<sup>a</sup>; Felipe, Santos<sup>a</sup>; Larissa, Kido<sup>b</sup>; Celina, Lamas<sup>a</sup>; Fábio, Montico<sup>a</sup>, Valéria, Cagnon<sup>a</sup>

(a) Department of Structural and Functional Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

(b) Department of Food and Nutrition, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Keywords: prostate cancer, inflammation, tempol, TRAMP, PC-3 and LNCaP

**CONFLICT OF INTEREST STATEMENT**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

**FUNDING STATEMENT**

This study was financed by São Paulo Research Foundation – FAPESP (grants: 2018/21647-6; 2021/02108-0) and in part by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – grant: 140699/2019-8).

## ABSTRACT

**Background:** Tempol is a redox-cycling nitroxide that acts directly on inflammation; however, few studies have reported tempol treatment in prostate cancer (PCa). The present study investigated tempol effects on inflammation related to NF $\kappa$ B signaling, considering hormonal dependent or independent cell lines and the TRAMP prostate cancer animal model in the early and late-stages of cancer progression.

**Methods:** *In vitro*, PC-3 and LnCaP cells were exposed to different tempol doses and cell viability assay was performed. The best treatment dose was chosen for a subsequent analysis by Western Blotting. *In vivo*, five experimental groups were evaluated regarding tempol effects in the early (CT12 and TPL12 groups) and late-stages (CT20, TPL20-I and TPL20-II) of PCa development. TPL groups were treated with 50 mg/Kg or 100mg/Kg of tempol. All control groups received water as a vehicle. The ventral lobe of the prostate was collected and submitted to immunohistochemical and Western blotting analyses.

**Results:** tempol treatment reduced *in vitro* cellular proliferation and improved prostatic morphological findings *in vivo*, decreasing tumor progression. Tempol reduced inflammation on the preclinical models studied. It downregulated the initial inflammatory signaling throughout Toll-like receptors intermediated or not by MyD88. In addition, it also upregulated  $\kappa$ B- $\alpha$  and - $\beta$  levels, leading to NF $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  and other inflammatory markers decreases. Tempol also influenced cell survival markers.

**Conclusions:** Tempol can be considered a beneficial therapy for PCa treatment with anti-inflammatory and anti-proliferative effects. Nevertheless, tempol action was different depending on the degree of the prostatic lesion, *in vivo*, and depending on the hormone reliance, *in vitro*. That indicates a multifaceted role of tempol as *per* the prostatic tissue environment.

## INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is the most common non-cutaneous malignancy disease and the second cause of deaths among men in the United States of America and Brazil<sup>1; 2</sup>. Several authors have focused their studies on the inflammatory role in PCa development, based on the hypothesis that inflammatory injury could prompt carcinogenesis<sup>3; 4</sup>. The sustained inflammation generates a multitude of reactive nitrogen and oxygen species, cytokines, chemokines, and growth factors. The constant high level of these factors potentially leads to uncontrolled cellular proliferation and enhanced genomic instability<sup>5</sup>. The NFκB transcription factor is considered a master regulator of inflammation in cancer and an important target in this control process for disease progression<sup>6</sup>.

Tempol (4-hydroxy-TEMPO) is a redox-cycling nitroxide that participates in the metabolism of many reactive oxygen species (ROS) and is considered a potent antioxidant<sup>7</sup>. It is a low toxic ampholyte compound with a high capacity to permeate cell membranes, the gastrointestinal tract or the blood-brain barrier<sup>8</sup>. A series of tempol actions were reported in literature, preserving mitochondria against oxidative damage and improving tissue oxygenation<sup>9; 10</sup>; playing a neuroprotective role<sup>11</sup>; protecting normal cells from radiation while maintaining radiation sensitivity of tumor cells<sup>12</sup>; and decreasing spontaneous tumor formation<sup>13</sup>. Tempol applications have been studied throughout the years in animal injury associated with increased ROS production, including cancer<sup>7</sup>.

The anti-tumor and cancer-preventative actions of tempol have been shown in literature related to its interactions with cancer chemotherapeutic agents. Ewees and colleagues<sup>14</sup> observed that tempol, used as an adjuvant treatment with Cisplatin, reduced the nephrotoxicity, and showed a protective role in the kidney. Recently, Ye et al.<sup>13</sup> demonstrated tempol action in proliferation suppression of ovarian cancer cells, and in the glutamine metabolism process, pointing to tempol as a therapeutic strategy in association with other anti-cancer drugs.

In addition, tempol seems to act directly on inflammatory processes, particularly on NFκB modulation<sup>15</sup>. However, despite tempol applications in cancer, few studies have reported tempol treatment for PCa and none of these studies have detailed its effects on inflammation in PCa analyses<sup>16; 17</sup>.

Among experimental procedures for PCa study, PC-3 and LNCaP are the most common cell models used to understand prostate tumoral behavior in the experimental procedures, evaluating the androgen responsiveness or not of cancer<sup>18; 19</sup>. Regarding *in vivo* studies, the TRAMP (transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate) model is considered a good

alternative to study PCa progression and chemoprevention approaches, with well-established cancer stages from 8 to 30 weeks of age<sup>20; 21; 22</sup>.

The aim of the study herein was to investigate tempol effects on inflammatory markers related to the NFκB signaling, considering differential responses of prostate cancer cell lines with distinct androgen reliance and TRAMP model in early and late-stage of cancer progression. We also aimed to show histopathological tempol effects, focusing on prostate cell proliferation and tumor incidence.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture and reagents**

Human PCa cell lines PC-3 and LNCaP were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and Rio de Janeiro Cell Bank (Rio de Janeiro, SP, Brazil), respectively. Both cell lines were maintained in RPMI-1640 medium (Vitrocell, SP, Brazil) at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Vitrocell, SP, Brazil) and 1% penicillin/streptomycin (Vitrocell, SP, Brazil). Tempol (4-hydroxy-TEMPO, 176141, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved directly in the medium at different concentrations.

### **Determination of cell viability**

The cells (PC-3  $1 \times 10^4$  cells; LNCaP  $1.5 \times 10^4$ ) were plated in 96-well plate in triplicate. After 24h of incubation, cells were treated with or without tempol diluted in the medium (0.5, 1, 2, 4, 8 and 10 mM) for 24, 48, and 72 h. At the end of the treatment, the cells were incubated with 80 μL of thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT; Sigma Aldrich, 5655, St. Louis, MO, USA) dye solution for 40 minutes. Then 80 μL of DMSO was added to each well to dissolve purple formazan crystals formed in viable cells. Optical density was measured at 570 nm in a spectrometer reader (Synergy™ 2, BioTek® Instruments, Inc., USA).

The IC<sub>50</sub> was calculated based on the MTT data. For subsequent analyses, one dose was chosen according to two conditions: [1] the dose must have presented statistical significance by ANOVA-One-Way test, post-Dunnet test; and [2] the dose must be lower than pointed in IC<sub>50</sub>. The lowest dose to meet both criteria in cell lines was found at 48h of exposure to tempol, 1mM for PC-3 and 2mM for LNCaP (see supplemental material, Results, fig.1 and 2). In order to explore the effects of the same dose on a longer exposure time, experiments were also performed for 72 hours of exposure.

### **Animals and experimental procedures**

50 male TRAMP mice (C57BL/6-Tg(TRAMP)8247Ng/J X FVB/NJ)F1/J) were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation of the State University of Campinas (CEMIB/ UNICAMP). The animals were divided into five experimental groups (n=10) in order to evaluate the effects of tempol in the early (CT12 and TPL12 groups) and late-stage (CT20, TPL20-I and TPL20-II) of PCa development (Fig.1). TPL groups were treated with 50 mg/Kg or 100mg/Kg of tempol (4-Hydroxy-TEMPO, 97%, Sigma-Aldrich - 176141) diluted in water, 5 times a week, during 4 weeks. After that, the animals were euthanized and ventral prostate lobes were processed for subsequent analyses. The experiment was carried out in accordance to Ethics Committee in the Use of Animals (CEUA 5115-1/2019, 5115-1(A)-2020).

### **Histopathological analysis**

Five samples of ventral prostate lobe were collected from each experimental groups and fixed in Bouin's solution. The samples, washed in ethanol at 70%, passed through subsequent dehydration in an increasing series of alcohols. The fragments were cleared in xylene for 2 hours and embedded in ultrafiltered paraffin plus plastic polymers (Paraplast Plus, ST. Louis, MO, USA). Next, the prostate samples were sectioned using a Hyrax M60 microtome (Zeiss, Munich, Germany), into a thickness of 5  $\mu$ m. Then, histological slides were stained in Hematoxylin-Eosin and photographed using a Nikon Eclipse E-400 photomicroscope (Nikon, Tokyo, Japan).

Histopathological analysis of the ventral prostate lobe was performed by capturing 10 random fields at 400x magnification. The photomicrographs were divided into four quadrants. In each quadrant, prostate tissue was classified based on the morphological characteristics: Healthy epithelium (HE), Low Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia (LGPIN), High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia (HGPIN), Well Differentiated Adenocarcinoma (WDA). Detailed classification criteria can be found in the supplemental material, Material and methods (table 1). The tissue morphological classification and lesion quantification were based on Berman-Booty et al.<sup>20</sup>, Gingrich et al.<sup>21</sup>, Kido et al.<sup>23</sup> and Silva et al.<sup>24</sup>.

Animals that presented a palpable prostate tumor were counted and classified for analyses for Undifferentiated Adenocarcinoma (UA) incidence. The lobe-specific tumor incidence was confirmed by dissection during the euthanasia. These data were represented in tumor incidence percentage and then this distribution was evidenced in each prostate lobe.

## **Immunohistochemistry**

Prostatic samples from the ventral lobe of 5 animals *per* group were collected and submitted to immunohistochemical analysis for PCNA, iNOS, COX-2 and IL-17 (for technical specifications, see Supplementary Material, Material and Methods, table 2). The prostate samples were sectioned using a Hyrax M60 microtome (Zeiss, Munich, Germany) into a thickness of 5  $\mu$ m, and collected in silanized slides. The antigen recovery was performed in citrate buffer (Ph 6.0) at 100°C in the microwave or treating with proteinase K, depending on the characteristics of the antibody. Blockade of endogenous peroxidases was obtained with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3% in methanol) with subsequent blockage in bovine serum albumin (BSA) solution (3% in TBS-T), during one hour at room temperature. The antibodies were diluted (1:35-500) in BSA 1% and applied in the tissue sections. The slides were storage overnight at 4 °C. After TBS-T buffer washing, the sections were incubated with HRP conjugated secondary antibody from the Envision HRP kit (Dako Agilent, USA) for 40 minutes and, later revealed with diaminobenzidine (DAB), according to manufacturer's instructions. The slides were counterstained with Harris' hematoxylin and analyzed using Nikon Eclipse E-400 photomicroscope (Nikon, Tokyo, Japan, 40X).

After immunostaining, ten photomicrographs *per* animal *per* molecule were captured and a grid of 400 intersection points was superimposed on each photomicrograph. The grid intersections were considered positive points when located over a positive region for the analyzed molecule. To determine the intensity of immunostaining, the number of positive points was divided by the total number of grid points (400). The mean of each group was composed by the mean of the relative frequency of PCNA, iNOS, COX-2 and IL-17 for each animal.

## **Western Blot analysis**

### *Sample preparation*

*In vitro* analysis: PC-3 ( $3 \times 10^5$ ) and LNCaP ( $4 \times 10^5$ ) cells were seeded in 60mm<sup>2</sup> plates and allowed to attach overnight. Then, the plates were treated with or without tempol for each cell line. The samples were collected after 48h and 72h of tempol treatment and processed for protein extraction. The experiment was performed with at least three passages of treated and properly processed PC-3 and LNCaP, being performed in technical and biological triplicate.

*In vivo* analysis: Prostatic samples (ventral lobe) were collected from 5 animals from each experimental group and processed for protein extraction.

### *Protein extraction*

*In vivo* and *in vitro* samples were lysed in non-denaturing extraction buffer (Lysis Buffer :NaCl 150mM, Tris-HCl 50Mm,1% Triton, 0,1% SDS, pH:8,00), plus 1% of aprotinin (A6279, *Sigma-Aldrich*). Then, the samples were homogenized using ultrasonic sonicator *SONICS VibraCellsTM* (*Sonics & Material, Inc., USA*) and the tissue homogenate was centrifuged during 20 minutes at 15000 rpm at 4°C. The protein quantification was measured by Bradford quantification method. Samples were mixed (1:1) with 2X sample buffer *Laemmli Sample Buffer* (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif., USA*) plus 5%  $\beta$ -mercaptanol, incubated in a dry bath at 95°C for 5 minutes.

### *Electrophoresis*

Equal amounts of protein (50 $\mu$ g) were blotted into 10–12% SDS-PAGE gel and transferred onto nitrocellulose membranes (*Hoefler System*). Membranes were blocked in BSA 3% and the blots were incubated overnight with primary antibodies (for technical specifications, see Supplementary Material, Material and Methods, table 2) and 2 h with a secondary antibody in the following day. The blot images were developed using a chemiluminescence kit (*Super Signal West Pico Chemiluminescent/Thermo Scientific/34080*). The bands were visualized and captured by *GeneGenome – Genesys system* and chemicamera (*Syngene, Cambridge, UK*). Pixels densitometry was calculated using the Uni-Scan-It 6.1 Program.  $\beta$ -actin was used as endogenous control for *in vivo* and *in vitro* analysis.

### **Statistical analysis**

*In vitro* analysis: Student's T Test was performed comparing control and treated groups for the chosen time points. ANOVA-One-way followed by Dunnett's test was carried out for cell viability assay.

*In vivo* analysis: the statistical analysis was considered separately for early-stage and late-stage groups. For the early-stage, Student's T Test was performed. For the late-stage, ANOVA-One-Way was performed, followed by Tukey's test.

All data was previously considered parametric after Shapiro-Wilk's Test. The statistical analysis was performed using GraphPad Prism and with the level of significance set at 5% (version 7.00).



## RESULTS

### Decrease of the cell viability of human prostate cancer with tempol treatment

In order to determine the best experimental conditions, PC-3 (androgen independent cell line) and LNCaP (androgen dependent cell line) were exposed to different tempol concentrations for 24, 48 and 72h. During the 24h of exposition, PC-3 showed lower sensitivity ( $IC_{50} = 6.3\text{mM}$ ) to tempol than LNCaP ( $IC_{50} = 4.2\text{mM}$ ). However, PC-3 response to tempol concentrations became more sensitive as time went by, and became significantly over sensitive, leading to inhibition after 48h ( $IC_{50} = 2.5\text{mM}$ ) and 72h ( $1.9\text{mM}$ ) at  $1.0\text{mM}$  concentration (Fig 2A - see criteria for dose choice in Material and Methods and supplementary material in item 2.1). On the other hand, LNCaP presented a *plateau* behavior with similar response during the 48h ( $IC_{50} = 2.3\text{mM}$ ) and 72h ( $IC_{50} = 2.2\text{mM}$ ) periods. Both were significantly inhibited at  $2.0\text{mM}$  concentration (Fig 2B) (in Material and Methods and supplementary material in item 2.1)

These results suggest that the efficacy of tempol treatment could be related to the androgen responsiveness of the human prostate cancer cells. The LNCaP cell androgen dependence indicates early, but sustained inhibition of viability with tempol throughout time. This result was confirmed based on the decrease of AR and PCNA protein levels with tempol for LNCaP cells at the 48 and 72h point in time (Fig 2D). However, the lack of PC-3 androgen responsiveness suggests a tempol action time-dependence. This result is confirmed by the PCNA decrease in PC-3 after  $1.0\text{mM}$  treatment for 48 and 72h (Fig 2C).

### Tempol modulated NF $\kappa$ B signaling pathway of human prostate cancer cells

The anti-inflammatory effects of tempol on PC-3 and LNCaP were evaluated, considering, different protein levels related to the NF $\kappa$ B pathway (Fig.3).

After tempol exposure, two main mechanisms were noticed for both cell lines. The first mechanism refers to the downregulation of the initial inflammatory signaling throughout Toll-like receptors. Tempol treatment showed no action on TLR4 (Fig. 3 A and B), but decreased the TLR2 levels after 48 and 72h of exposition for both cell lines (Fig. 3 C and D). In addition, tempol also downregulated the MyD88 level, an important cytosolic adapter protein that plays a central role in the immune response (Fig. 3 E and F). The similar responses of TLR4, TLR2 and MyD88 for LNCaP and PC-3 to tempol exposition suggest that this nitroxide is acting directly throughout the TLR-MyD88 pathway.

The second mechanism observed in both cell lines is related to the NF $\kappa$ B cytosolic inhibition. Tempol upregulated levels of I $\kappa$ B- $\alpha$  and I $\kappa$ B- $\beta$ . The I $\kappa$ B- $\alpha$  was upregulated after 48h of tempol treatment for PC-3 and after 72h for LNCaP (Fig.3 G

and H). The  $\text{I}\kappa\text{B-}\beta$  was, particularly, affected by tempol treatment, which was upregulated after 48 and 72h for both cell lines (Fig.3 I and J).

### **Downregulation of NF $\kappa$ B and other inflammatory marker levels after tempol exposure on human prostate cancer cells**

PC-3 showed a decrease in NF $\kappa$ B, pNF $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  levels for all tempol treatment exposition times (Fig.4 A, C and E). Effective downregulation of NF $\kappa$ B and pNF $\kappa$ B after 72h of tempol treatment was verified in LNCaP. (Fig.4, B and D). The inflammatory marker, TNF- $\alpha$ , decreased in LNCaP after 48 and 72h of exposition (Fig.4 F).

### **Possible interference of tempol in mechanisms related to cell death and survival in human prostate cancer cell lines**

The results showed the tempol ability to interfere in cell death and survival markers. Tempol caused negative STAT-3 modulation, an important transcription factor related to the activation of inflammatory genes, in both cell lines for treatment times (Fig.5 A and B). In addition, the presence of tempol reduced the BCL-2 anti-apoptotic protein levels mainly in the androgen-independent cell line, PC-3 (Fig.5 C). For the androgen-dependent cell, LNCaP, the reduction of BCL-2 occurred only after 72h of tempol exposition. In contrast, tempol treatment did not really act on the pro-apoptotic protein BAX or Caspase-3. Caspase-3 just reduced after 48h for LNCaP (Fig.5).

### **Tempol reduced malignant lesion incidence changing PCNA and AR protein levels *in vivo***

In the TRAMP model, tempol treatment increased healthy epithelium frequency in the early and late-stages of prostate cancer. Low-grade PIN was not altered for both stages, but high-grade PIN incidence was significantly reduced in TPL12 and TPL20-I. The 100mg/kg tempol dose in the TPL20-II group showed no effects on high-grade PIN frequency. All treatments were able to reduce well-differentiated adenocarcinoma incidence in the tempol groups in relation to the respective control groups. Finally, we observed not only an improvement in the morphological parameters after tempol treatment, but also PCNA epithelial immunolocalization reduction (see supplementary material item 2.2). In addition, in the early-stage of prostate cancer, AR protein level decreased after tempol treatment. In the late-stage, we observed AR level reduction only in the TPL20-II group (Fig. 6 and 7).

In the early stage, the occurrence of undifferentiated adenocarcinoma was not frequently noticed. However, for the CT20 group, approximately 80% of the animals presented a visible

tumor. Results in the late-stage showed a low incidence of undifferentiated adenocarcinoma in the TPL20-I and -II (Fig. 7) after tempol treatment.

### **NFκB *in vivo* modulation by tempol in stages of cancer progression**

The evaluation of tempol anti-inflammatory effects in different stages of PCa progression showed important differential responses based on the cancer stages. Specifically, when considering that there was modulation of NFκB signaling *in vitro* after tempol exposure.

The mechanism referring to initial inflammatory signaling through Toll-like receptors showed differential TLR4, TLR2 and MyD88 involvement in the early and late-stages of treatment. In the early-stage, TLR4 (Fig. 8 A) was not altered after treatment however tempol downregulated the TLR2 levels (Fig. 8 C). For this stage, we observed a MyD88 level increase after exposition (Fig. 8 E). At the same time, tempol decreased TLR4 and increased TLR2 levels for both treatment doses in the late-stage (Fig. 8 B and D). MyD88 protein levels decreased with TPL20-I and increased with TPL20-II (Fig. 8 F). In this way, the MyD88 results may suggest the hypothesis that the initial inflammatory signaling *in vivo* was not always MyD88-dependent.

The mechanism related to NFκB cytosolic inhibition showed that  $\text{I}\kappa\text{B-}\beta$  was particularly affected by tempol treatment, which was similar to the result observed for the cell lines (Fig. 8 I and J). The  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  was downregulated in the early-stage of treatment and then upregulated in the late-stage (Fig. 8 G and H).

### **Downregulation of inflammatory markers by tempol *in vivo***

After tempol treatment, NFκB and pNFκB were downregulated in the early-stage (Fig. 9 A and C). In the late stage, both doses decreased the NFκB levels (Fig. 9 B) and pNFκB levels increased with TPL20-II (Fig. 9 D). The TNF- $\alpha$ , an important proinflammatory cytokine, decreased after tempol treatment with TPL12, TPL20-I and -II (Fig. 9 E and F).

Other inflammatory markers were measured in the TRAMP model and we observed a decrease of iNOS, COX-2 and IL-17 immunostaining in the early-stage of treatment (Fig. 9 a). COX-2 and iNOS did not respond to tempol treatment in late-stage (Fig. 9 G-P) (See supplemental material, item 2.2).

### **Tempol influenced cell death and survival *in vivo***

Tempol treatment altered STAT-3 and pSTAT-3 protein levels in the TRAMP model. In the early-stage, STAT-3 and pSTAT-3 decreased in the TPL12 group (Fig. 10 A and C). In

the late-stage, STAT-3 increased in the TPL20-II group and pSTAT-3 decreased in the TPL20-I and -II groups (Fig.10 B and D).

We observed an increase in BCL-2, an anti-apoptotic protein, associated with a BAX level decrease, a pro-apoptotic protein, in the early-stage (Fig. 10 E and G). This tendency shows a very different direction from what was observed in the cell lines, suggesting an attempt towards tissue protection in this stage of cancer progression, as there is a morphological dominance of healthy tissue in the TPL12 group.

In the late-stage, BCL-2 increased and BAX levels decreased in the TPL20-II group (Fig.10 F and H).

## DISCUSSION

It is the first time that the relationship between the inflammatory process and the tempol application in PCa preclinical models is reported, pointing to the potential therapeutic role of tempol in the inflammation. The results herein indicated molecular alterations in inflammatory signaling not only *in vitro*, in PC-3 and LNCaP tumor cells, but also *in vivo*, in the early and late-stages of TRAMP model cancer progression. Tempol treatment improved histopathological features of the prostate ventral lobe and delayed the PCa evolution, protecting tissue of carcinogenesis advance, particularly, in the early-stage of cancer progression.

Tempol is considered a non-toxic compound, but there is no consensus about dose and/or time for drug administration<sup>7</sup>. Some *in vitro* studies evaluated different tempol dose on prostate cancer cell lines ranging from 0.25mM to 4mM<sup>16; 17</sup>, however, the correlation between dose and time exposition was not evaluated. The present cell viability results showed that the sensitivity to tempol could be directly linked to the androgen independence or dependence of the PC-3 and LNCaP cells. Thomas and Sharifi<sup>17</sup> verified AR protein level decrease in LNCaP after treatment with 2.5mM tempol for 48h, which was confirmed by increased number of LNCaP cells in the SubG0 phase.

In agreement with the cell viability results, the histopathological improvement in the TRAMP ventral lobe in the early and late-stages was also associated with decreased AR and PCNA levels. The histological findings can be considered as a tempol dose reference and time administration guide for *in vivo* experiments, since it was the first time that tempol was tested on the TRAMP model. *In vivo* studies, which added tempol to water, it was largely effective at 1 to 6 mmol<sup>-1</sup> concentrations, and showed no evidence of dose dependence in this concentration range<sup>7; 8</sup>. Tempol dose-dependent effects on the TRAMP prostate were not clearly observed in the TPL20-II group in the present results.

The relationship among tissue remodeling, proliferation signals and the inflammatory markers has already been established in literature<sup>5</sup>. Therefore, cell viability decreases *in vitro*, prostate lesion, and tumor incidence decrease *in vivo* can be considered positive signals of the anti-inflammatory role of tempol. Studies have shown that decreased cell proliferation is a strong signal of the reduced NFκB expression<sup>25</sup>. Androgen-independent cell lines, such as PC-3 and DU-145, have shown higher NFκB levels, when compared to androgen-dependent cell lines such as LNCaP and PNT1A, which have low basal NFκB activation<sup>26; 27</sup>. Shukla et al.<sup>28</sup> verified increased NFκB expression during the PCa progression in the TRAMP model. In the present results, tempol treatment downregulated NFκB levels in all the experimental procedures studied. Based on that, we suggested a mechanistic hypothesis for tempol action, indicating two distinct modulation points: (I) tempol led to a decrease or delay in the onset of the inflammatory cascade and (II) tempol increased the NFκB inhibitor levels, both *in vitro* and *in vivo*.

Regarding tempol ability of decreasing or delaying the onset of the inflammatory cascade, decreased TNF-α levels confirmed this hypothesis in the *in vitro* and *in vivo* evaluation. Non-activated NFκB is located in the cell cytoplasm in association with proteins known as NFκB inhibitors, such as IκB's<sup>29; 30</sup>. NFκB is then quickly recruited in response to a wide variety of stimuli including pathogen signals, stress signals, and pro-inflammatory cytokines such as TNF-α and interleukins<sup>31</sup>. Similarly, the TNF-α production itself is amplified by the NFκB activation, leading to an intensification of the inflammatory process, due to the greater production of inflammatory cytokines, in a positive feedback<sup>31</sup>. The TNF-α level reduction in all experimental procedures studied here emphasizes the tempol potential as an eligible PCa therapy, due to the suppressive effects on inflammation in the various specificities of this disease.

Decreased initial inflammatory signaling by tempol is also confirmed by differential modulation of Toll-like receptors and MyD88. TLR4 and TLR2 are widely investigated in the PCa microenvironment, whose expression is not restricted to immune cells, but also to healthy prostatic epithelial cells<sup>32</sup> and cancer cells<sup>33</sup>. Based on the present results verified in the tumoral cells, PC-3 and LNCaP, tempol action predominantly modulated TLR2 and MyD88, but did not involve TLR4. Literature has shown that the signaling pathway through TLRs, especially through TLR4, can be regulated whether MyD88 is involved or not<sup>34</sup>. The lower MyD88 levels, found after tempol treatment, indicates the possibility of the inflammation signaling to be modulated by tempol in the tumoral cells by means of a MyD88-dependent pathway. TLR4 activation, when it is dependent on the MyD88 coupler, leads to MyD88 activation, which

recruits IRAK and TRAF6 mediators, and degrades  $\text{I}\kappa\text{B}-\beta$ , uninhibiting NF $\kappa$ B and resulting in the production of pro-inflammatory cytokines<sup>34</sup>.

Considering the *in vivo* results in the present study, early-stage treatment was characterized by increased MyD88 levels. Thus, it can be suggested that the tempol action does not always occur dependently of MyD88 in the TRAMP model. This quite probably is due to the decrease in inflammatory signaling, caused by the lower TLR2 activation. On the other hand, the TLR4 level decrease in the late-stage cancer group, suggests a decrease in the inflammatory signaling by means of the TLR4-MyD88-dependent pathway and demonstrates that the 50mg/kg tempol dose was more efficient than the 100mg/kg dose in MyD88 decreasing.

In addition, tempol was able to activate the NF $\kappa$ B inhibitor family, pointing to another downstream mechanism for inflammatory markers. We evaluated  $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$  and  $\text{I}\kappa\text{B}-\beta$  protein levels, which play an additional role in regulating the NF $\kappa$ B activity when they are degraded. The  $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$  is responsible for the rapid and transient NF $\kappa$ B activation, which is quickly degraded in response to the extracellular signaling and resynthesized soon after<sup>35</sup>. The  $\text{I}\kappa\text{B}-\beta$ , in turn, regulates the chronic and persistent NF $\kappa$ B activation<sup>36</sup>. In this way, it is important to indicate that, in the present study, the NF $\kappa$ B decrease occurred in the androgen-dependent LNCaP, only when  $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$  and  $\text{I}\kappa\text{B}-\beta$  showed a simultaneous increase in their protein levels. In addition, tempol significantly increased the  $\text{I}\kappa\text{B}-\beta$  levels, which were constantly upregulated in all the experimental PCa methodologies studied. Based on this, we can infer that tempol stimulates chronic and persistent NF $\kappa$ B maintenance in cytosol, due to high  $\text{I}\kappa\text{B}-\beta$  levels.

Tempol also decreased other *in vivo* inflammatory markers, such as IL-17, COX-2, and iNOS, particularly in the early-stage group, which are known to be involved in the transition from prostatic intraepithelial neoplasms to well-differentiated or undifferentiated adenocarcinoma<sup>5; 37</sup>. The present results reported that tempol also interfered in cellular death and survival. BAX and BCL-2 molecules are related to STAT-3 and are directly involved in apoptosis and programmed cell death, collaborating in maintaining the balance between healthy survival and tissue death<sup>38</sup>. The mechanism of increasing anti-apoptotic proteins, such as BCL-2, or decreasing pro-apoptotic proteins, such as BAX, is an important mechanism of tumor cells to escape from apoptosis<sup>38; 39</sup>.

Significant tempol action was observed in PC-3 and LNCaP, which decreased the BCL-2 levels. However tempol effects were not so obvious for pro-apoptotic BAX and Caspase-3. *In vivo* results suggest that tempol acts like a tissue protector, increasing BCL-2 and decreasing BAX in the early-stage. Studies have pointed out that tempol acting like a tissue protector classifies it as an important drug in adjuvant therapies<sup>40</sup>. In addition, the morphological results

confirm the predominance of healthy tissue in the prostatic epithelium of TRAMP mice in TPL12 group when compared to CT12. Ge et al.<sup>41</sup> showed that tempol led to the upregulation of BCL-2 and a BAX decrease in an induced acute hepatotoxic model. In the late-stage group, tempol particularly interfered in the p-STAT-3 levels, in both tempol treatment doses. This is an important finding, since STAT-3 is a transcription factor which regulates the gene expression related to cell cycle, cell survival and immune response, associated with cancer progression and malignancy<sup>42</sup>. Based on the results, tempol does not seem to exert its effects on pro-apoptotic proteins in any experimental procedure considered. On the other hand, it was able to modulate STAT-3, which is essential in cell survival and is a factor that is directly involved in NFκB signaling<sup>43</sup>.

## CONCLUSION

This study identified that tempol affected cell viability, proliferation and survival of human prostate cancer cell lines with distinct genetic background.

Tempol demonstrated chemopreventive activity, delaying PCa progression in the TRAMP model, as well as protecting the healthy prostate tissue. Furthermore, doubling the tempol dose *in vivo* did not maximize the effects in glandular response as seen with the lowest dose. Tempol showed itself to be efficient on the inflammatory process, affecting Toll-like receptors, activating or not the MyD88-dependent pathway and increasing NFκB inhibitors.

Finally, tempol can be considered a beneficial therapy for PCa treatment with anti-inflammatory and anti-proliferative effects. Nevertheless, tempol action was different depending on the degree of the prostatic lesion, *in vivo*, and depending on the hormone reliance, *in vitro*. That indicates a multifaceted role of tempol as *per* the prostatic tissue environment. Thus, new research will be useful to get more details about tempol actions around PCa angiogenesis, oxidative stress and matrix remodeling.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed by São Paulo Research Foundation – FAPESP (grants: 2018/21647-6; 2021/02108-0) and in part by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – grant: 140699/2019-8).

## REFERENCES

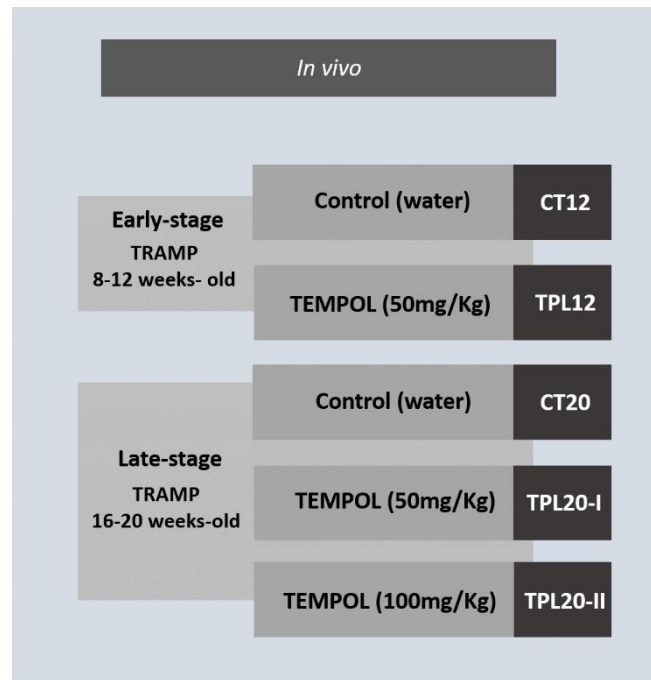
- [1] SIEGEL, RL; MILLER, KD; FUCHS, HE; JEMAL, A. Cancer Statistics: 2022. *CA Cancer J Clin.*, v.72, n.1, p. 7–33, 2022. doi:10.3322/caac.21708
- [2] INCA. Câncer de Próstata. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>>. Acess: abril, 4<sup>th</sup>, 2020.
- [3] CAI, T.; SANTI, R.; TAMANINI, I; et al. Current knowledge of the potential links between inflammation and prostate cancer. *Int J Mol Sci.*, v.20, n.15, p.3833, 2019. doi: 10.3390/ijms20153833.
- [4] FALLEIROS-JÚNIOR, LR; PEREZ, APS; TABOGA, S; et al. Neonatal exposure to ethinylestradiol increases ventral prostate growth and promotes epithelial hyperplasia and inflammation in adult male gerbils. *Int J Exp Pathol.*, v.97, n.5, p. 380-8, 2016. doi: 10.1111/iep.12208.
- [5] TEWARI, AK; STOCKERT, JA; YADAV, SS; et al. Inflammation and prostate cancer. *Adv Exp Med Biol.*, v.1095, p.41-65, 2018. doi: 10.1007/978-3-319-95693-0\_3.
- [6] NGUYEN, DP; SHALINI, J; YADAV, S; TEWARI, AK. Recent insights into NF- $\kappa$ B signalling pathways and the link between inflammation and prostate cancer. *BJU Int.*, v.114, n.2, p.168-176, 2014. doi: 10.1111/bju.12488
- [7] WILCOX, CS. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol Ther.*, v.126, n.2, p.119–145, 2010.
- [8] WILCOX, CS; PEARLMAN, A. Chemistry and antihypertensive effects of Tempol and other nitroxides. *Pharm Rev*, 60 (2008), pp. 418-469.
- [9] AHMED, LA; SHEHATA, NI; ABDELKADER, NF; KHATTAB, MM. Tempol, a superoxide dismutase mimetic agent, ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity through alleviation of mitochondrial dysfunction in mice. *PLoS One.*, v.9, n.10, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0108889.
- [10] SILVA, HNM; COVATTI, C; ROCHA, GL; et al. Oxidative Stress, inflammation, and activators of mitochondrial biogenesis: Tempol targets in the diaphragm muscle of exercise trained - mdx mice. *Front Physiol.*, v. 12, 2021. doi: 10.3389/fphys.2021.649793.
- [11] SPEJO, AB; TELES, CB; ZUCCOLI, GDS; OLIVEIRA, ALR. Synapse preservation and decreased glial reactions following ventral root crush (VRC) and treatment with 4-hydroxy-tempo (TEMPOL). *J Neurosci Res.*, v.97, n.4, p.520-534, 2019. doi: 10.1002/jnr.24365.
- [12] SOULE, BP; HYODO, F; MATSUMOTO, KI. et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radic Biol Med.*, v.42, n.11, p.1632–1650. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.030.



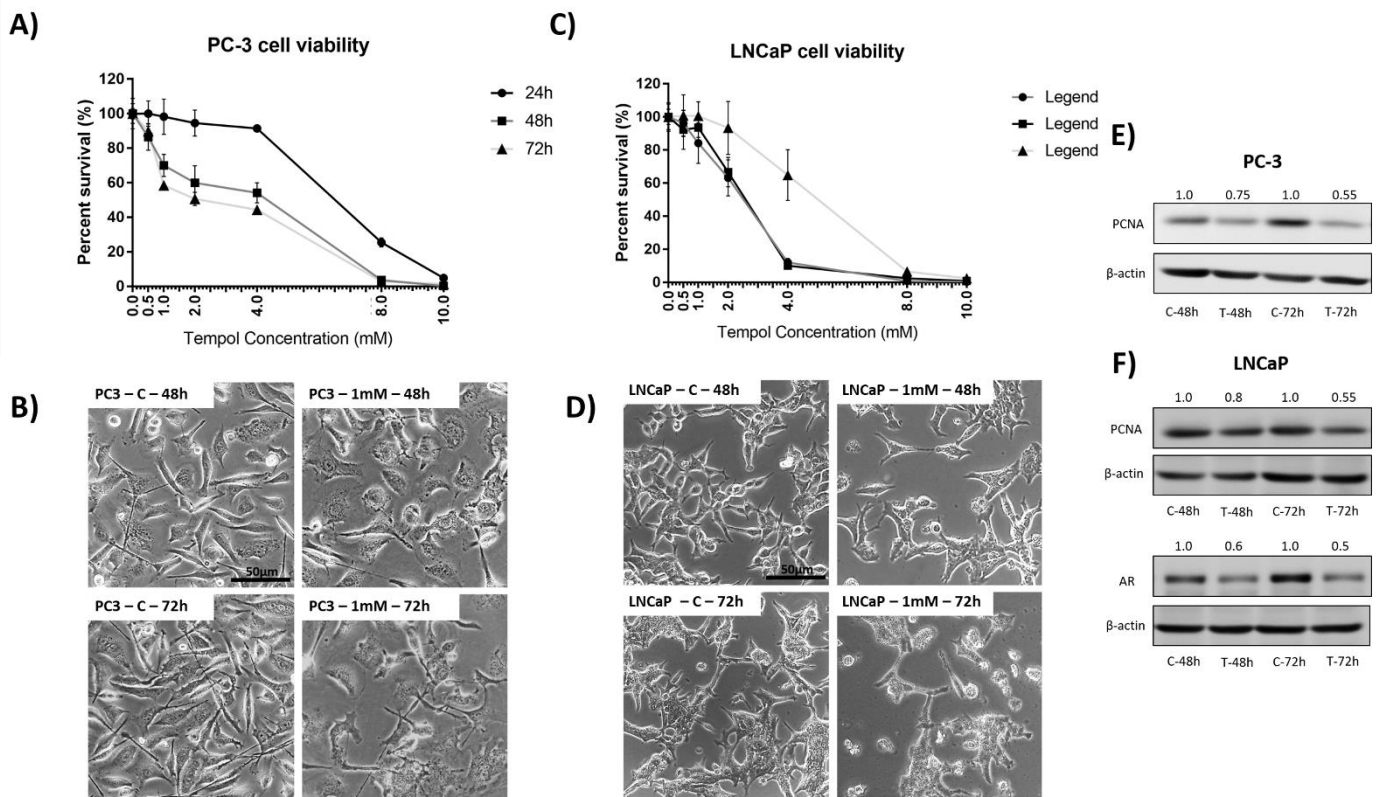
- [13] YE, S; XU, P; HUANG, M; et al. The heterocyclic compound Tempol inhibits the growth of cancer cells by interfering with glutamine metabolism. *Cell Death and Disease.*, v. 11, article number: 312, 2020. doi.org/10.1038/s41419-020-2499-8.
- [14] EWEES, MG; MESSIHA, BAS; ABDEL-BAKKY, MS; et al. Tempol, a superoxide dismutase mimetic agent, reduces cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Drug Chem Toxicol.*, n.42, v.6, p.657-664, 2018. doi: 10.1080/01480545.2018.1485688.
- [15] CUZZOCREA, S; PISANO, B; DUGO, L; et al. Tempol reduces the activation of nuclear factor- $\kappa$ B in acute inflammation. *Free Radical Res.*, v.38, n.8, p.813–819, 2004. doi: 10.1080/10715760410001710829.
- [16] LEJEUNE, D; HASANUZZAMAN, M; PITCOCK, A; et al. The superoxide scavenger TEMPOL induces urokinase receptor (uPAR) expression in human prostate cancer cells. *Mol Cancer.*, v.5, n.21, 2006. doi: 10.1186/1476-4598-5-21.
- [17] THOMAS, R; SHARIFI, N. SOD mimetics: a novel class of androgen receptor inhibitors that suppresses castration-resistant growth of prostate cancer. *Mol. Cancer Ther.*, v. 11, p. 87-97, 2012.
- [18] NAMEKAWA, T; IKEDA, K; HORIE-INOUE, K; INOUE1, S. Application of prostate cancer models for preclinical study: advantages and limitations of cell lines, patient-derived xenografts, and three-dimensional culture of patient-derived cells. *Cells*, v.8, n.1, p.74, 2019. doi: 10.3390/cells8010074.
- [19] SANMUKH, SG; DOS SANTOS, NJ; BARQUILHA, C; et al. Bacteriophages M13 and T4 increase the expression of anchorage-dependent survival pathway genes and down regulate androgen receptor expression in LNCaP prostate cell line. *Viruses-Basel*, v. 13, n. 9, 2021. doi: 10.3390/v13091754.
- [20] BERMAN-BOOTY, LD; SARGEANT, AM; ROSO, TJ; et al. A Review of the existing grading schemes and a proposal for a modified grading scheme for prostatic lesions in TRAMP mice. *Toxicologic Pathology*, v.40, n.1, p.5–17. doi: 10.1177/0192623311425062
- [21] GINGRICH, JR; BARRIOS, RJ; FOSTER, BA; GREENBERG, NM. Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, v. 2, n. 2, p. 70-75, 1999. DOI: 10.1038/sj.pcan.4500296.
- [22] KIDO, L. A.; LAMAS, C. A.; MARÓSTICA, M. R.; CAGNON, V. H. Q. Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP) model: A good alternative to study PCa progression and chemoprevention approaches. *Life Sciences*, v. 217, p 141-7, 2019. doi: 10.1016/j.lfs.2018.12.002.

- [23] KIDO, LA; MONTICO, F; SAUCE, R; et al. Anti-inflammatory therapies in TRAMP mice: delay in PCa progression. *Endocrine-Related Cancer*, v. 23, n. 4, p. 235-250, 2016. doi: 10.1530/ERC-15-0540.
- [24] DA SILVA, RF; NOGUEIRA-PANGRAZI, E; KIDO, LA; et al. Nintedanib antiangiogenic inhibitor effectiveness in delaying adenocarcinoma progression in Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP). *J Biomed Sci*, v.24, n.1, p.31, 2017. doi: 10.1186/s12929-017-0334-z.
- [25] DURAND, JK; BALDWIN, AS. Targeting iKK and NF $\kappa$ B for therapy. *Adv Protein Chem Struct Biol*, v.107, p.77-115, 2017. doi: 10.1016/bs.apcsb.2016.11.006.
- [26] PALAYOOR, ST; YOUMELL, MY; CALDERWOOD, SK. et al. Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene*, v.18, n.51, p.7389-94, 1999. doi: 10.1038/sj.onc.1203160.
- [27] GASPARIAN, AV; YAO, YJ; KOWALCZYK, D; et al. The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci*, v.115. p.141-51, 2002. doi: 10.1242/jcs.115.1.141
- [28] SHUKLA S; MACLENNAN GT; MARENCO SR; et al. Constitutive activation of PI3 K-Akt and NF-kappaB during prostate cancer progression in autochthonous transgenic mouse model. *Prostate*, v.64, p. 224–239, 2005. doi: 10.1002/pros.20217
- [29] GHOSH, S; MAY, MJ; KOPP, EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, v.16, p.225-60, 1998. doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.225.
- [30] LI, Q; VERMA, IM. The nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)/REL family. *Nat Rev Immunol*, v.2, n.10, p.725-34, 2002. doi: 10.1038/nri910.
- [31] KALLIOLIAS, GD; IVASHKIV, LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*, v.12, n.1, p.49-62, 2016. doi: 10.1038/nrrheum.2015.169.
- [32] TAKEDA, K; KAISHO, T; AKIRA, S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, v. 23, p. 335-76, 2003. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126.
- [33] MENENDEZ, D; AZZAM, MSK; GARANTZIOTIS, S; et al. The Toll-like receptor gene family is integrated into human DNA damage and p53 networks. *PLoS Genet*, v.7, n.3, 2011. doi: 10.1371/journal.pgen.1001360.
- [34] OU, T; LILLY, M; JIANG, W. The pathologic role of Toll-Like receptor 4 in prostate cancer. *Front Immunol*, v.9, p.1188, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.01188.

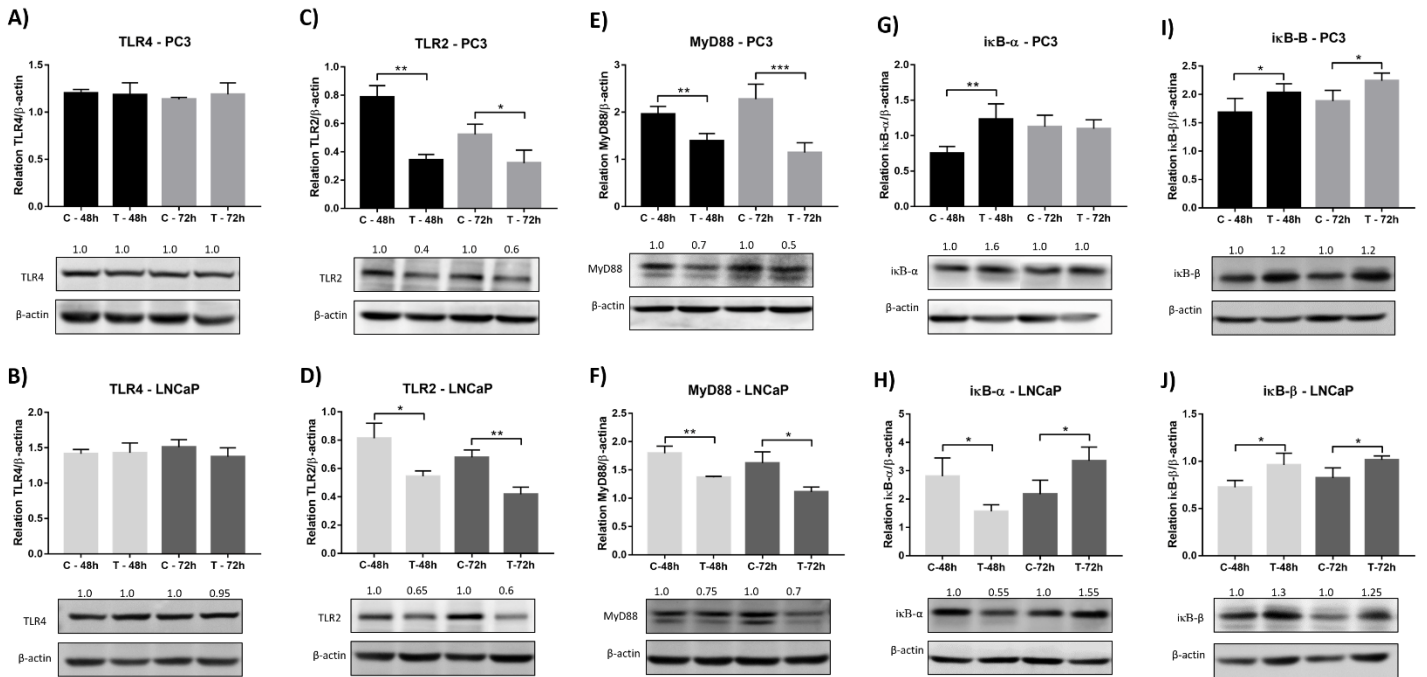
- [35] THOMPSON, JE; PHILLIPS, RJ; ERDJUMENTBROMAGE, H; et al. I $\kappa$ B $\beta$  regulates the persistent response in a biphasic activation of NF- $\kappa$ B. *Cell*, v.80, n.4, p.573-82. doi: 10.1016/0092-8674(95)90511-1.
- [36] WEIL, R; WHITESIDE, ST; ISRAEL, A. Control of NF- $\kappa$ B activity by the I $\kappa$ B $\beta$  inhibitor. *Immunobiol*, v.198, p. 14-23, 1997.
- [37] ZHANG, Q; LIU, S; GE, D; et al. Interleukin-17 promotes formation and growth of prostate adenocarcinoma in mouse models. *Cancer Res*, v.72, n.10, p2589-2599, 2012. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3795.
- [38] FAN, Y; MAO, R; YANG, J. NF- $\kappa$ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein Cell*, v.4, n.3, p. 176-185, 2013. doi: 10.1007/s13238-013-2084-3.
- [39] PAUL-SAMOJEDNYA, M; KOKOCIŃSKAB, D; SAMOJEDNY, A; et al. Expression of cell survival/death genes: Bcl-2 and Bax at the rate of colon cancer prognosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1741, p. 25–2926; 2005. doi:10.1016/j.bbadis.2004.11.021.
- [40] ABOUZIED, MM; ELTAHIR, HM; TAYE, A; ABDELRAHMAN, MS. Experimental evidence for the therapeutic potential of tempol in the treatment of the acute liver injury. *Mol. Cell. Biochem.*, v.411, p. 107-115, 2016.
- [41] GE, Z; WANG, C; ZHANG, J. Tempol protects against acetaminophen induced acute hepatotoxicity by inhibiting oxidative stress and apoptosis. *Front Physiol*, v.10, p.660, 2019. doi: 10.3389/fphys.2019.00660.
- [42] FURTEK, SL; BACKOS, DS; MATHESON, CJ; REIGAN, P. Strategies and approaches of targeting stat3 for cancer treatment. *ACS Chem Biol*, v.11, n.2, p:308-18, 2016. doi: 10.1021/acscchembio.5b00945.
- [43] SHRIHARI, TG. Dual role of inflammatory mediators in cancer. *Ecancermedicalscience*, v.11, 2017. doi: 10.3332/ecancer.2017.721.

**FIGURES FILE – ARTIGO I**

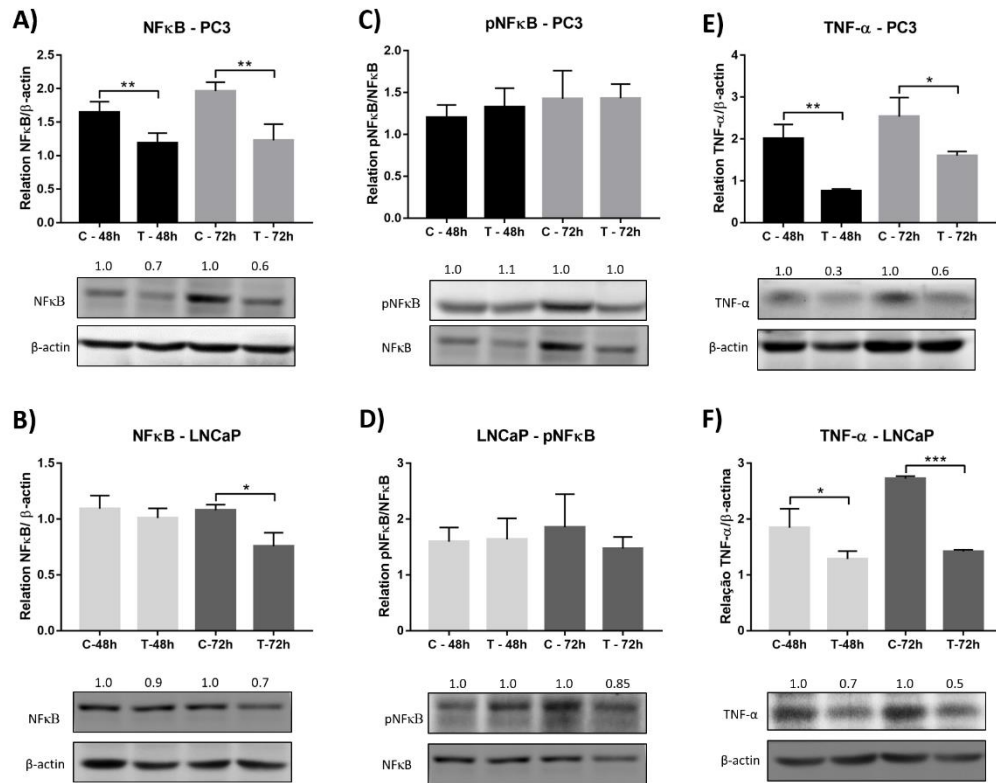
**Figure 1.** Experimental groups: *in vivo* tempol treatment according to prostate cancer progression.



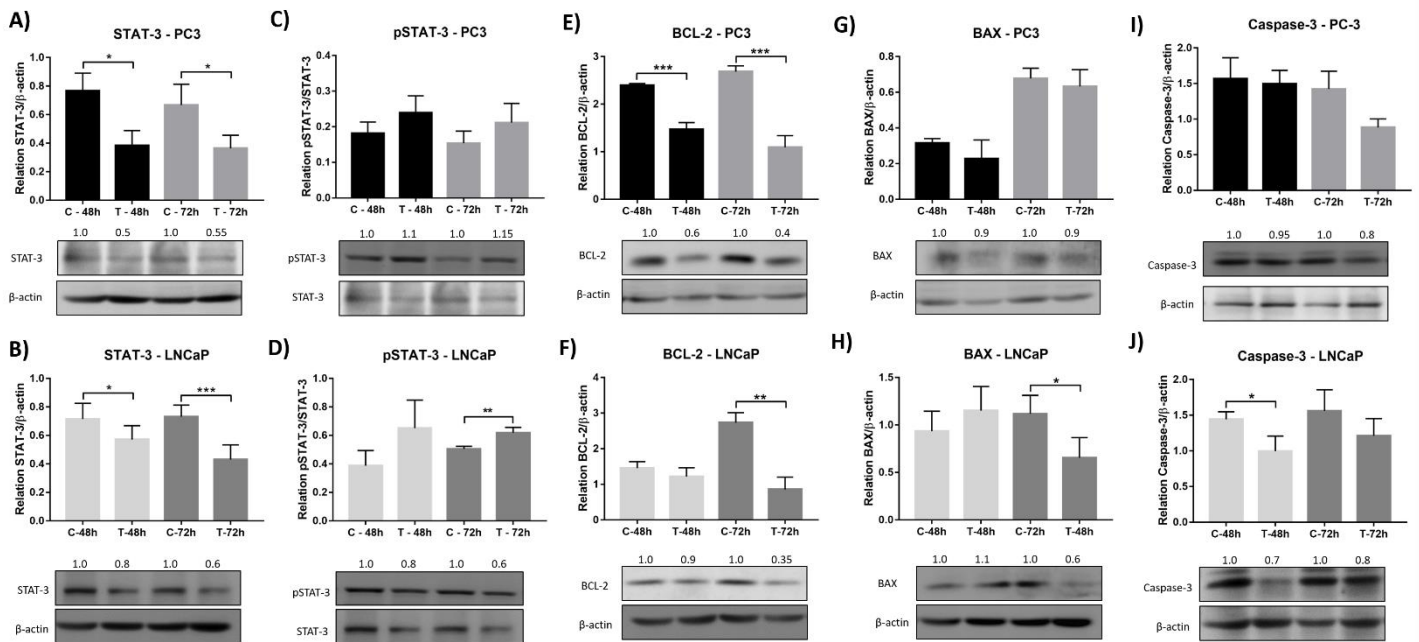
**Figure 2.** **A.** Viability of the PC-3 cell line after 24, 48 and 72h of exposition to different doses of tempol diluted in the medium. **B.** Photomicrographs of the PC-3 Control and Tempol groups. **C.** Viability of the LNCaP cell line after 24, 48 and 72h of exposition to different doses of tempol diluted in the medium. **D.** Photomicrographs of LNCaP Control and Tempol groups. **E.** Representative western blot bands demonstrating the effect of 1.0mM of tempol at 48 and 72h on PC-3 cells. **F.** Representative western blot bands, demonstrating the effect of 2.0mM of tempol at 48 and 72h on LNCaP cells. Numbers above the bands indicate fold-change of protein level when compared to the respective control group.



**Figure 3.** PC-3 and LNCaP protein levels after tempol treatment, representative bands of protein blots and the respective fold-change related to control. Statistical significance was considered between the treated and non-treated group of the same time point (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ).

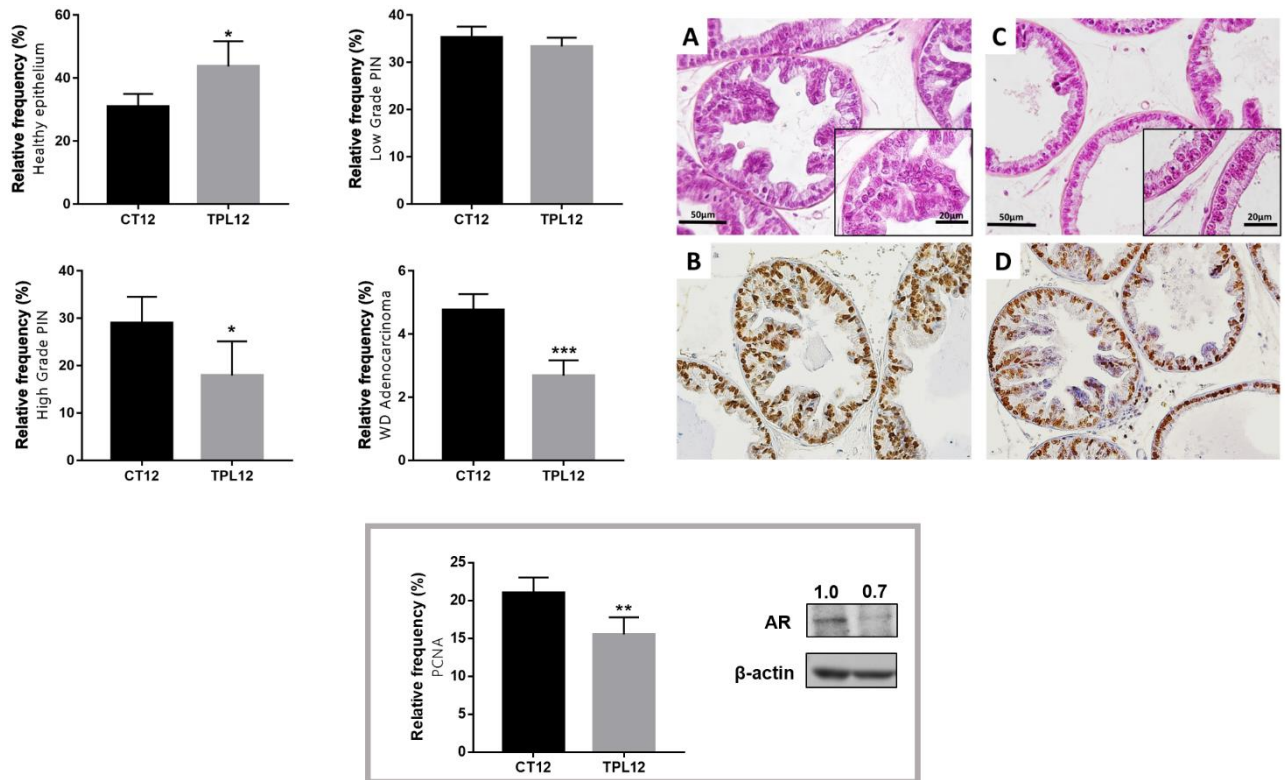


**Figure 4.** PC-3 and LNCaP protein levels after tempol treatment, representative bands of protein blots and the respective fold-change related to control. Statistical significance was considered between the treated and non-treated group of the same time point (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ).

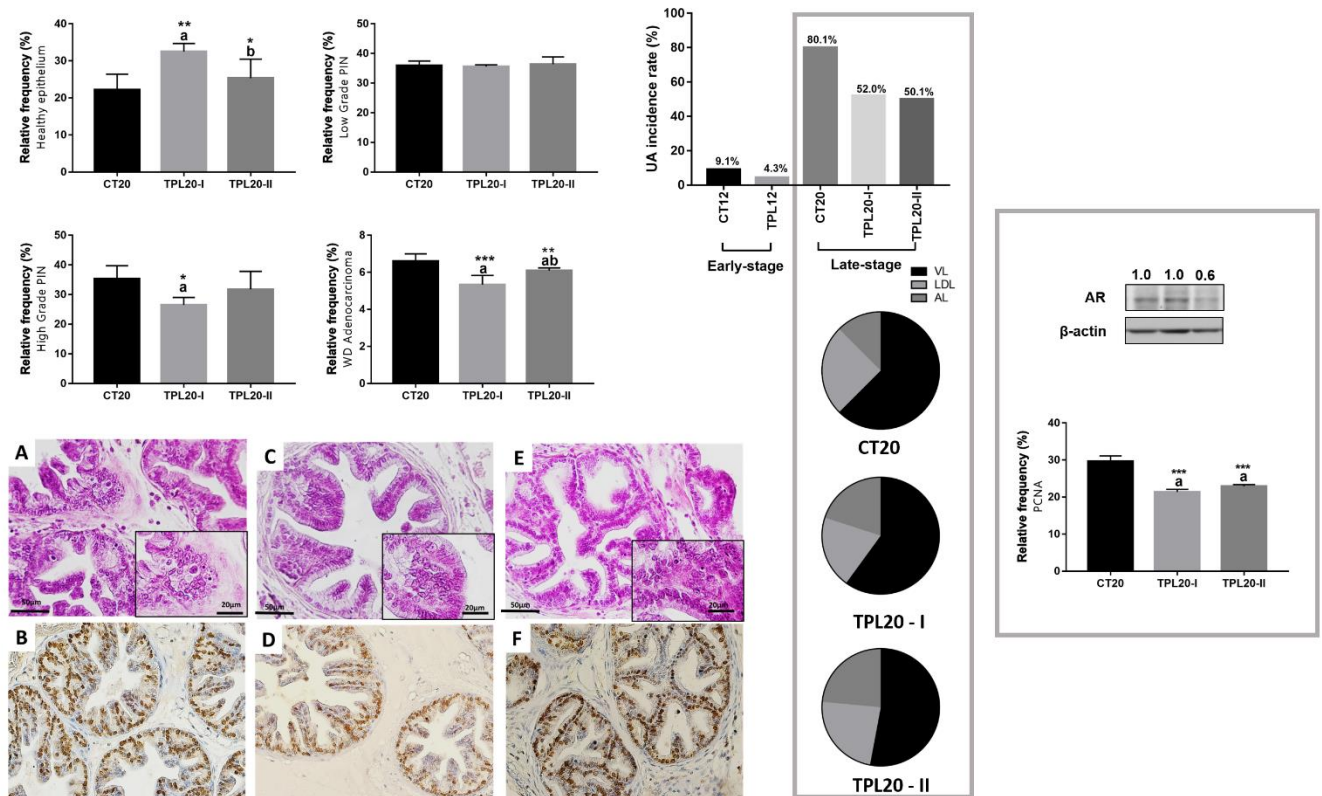


**Figure 5.** PC-3 and LNCaP protein levels after tempol treatment, representative bands of protein blots and the respective fold-change related to control. Statistical significance was considered between the treated and non-treated group of the same time point (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ).

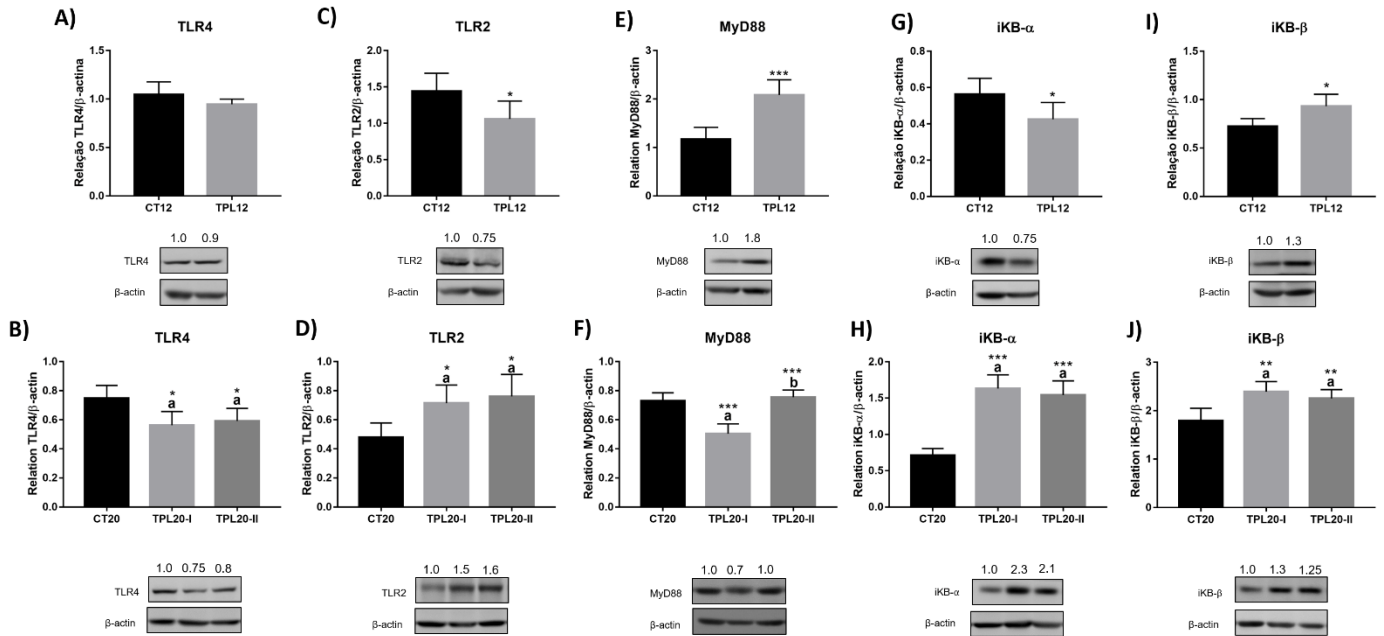




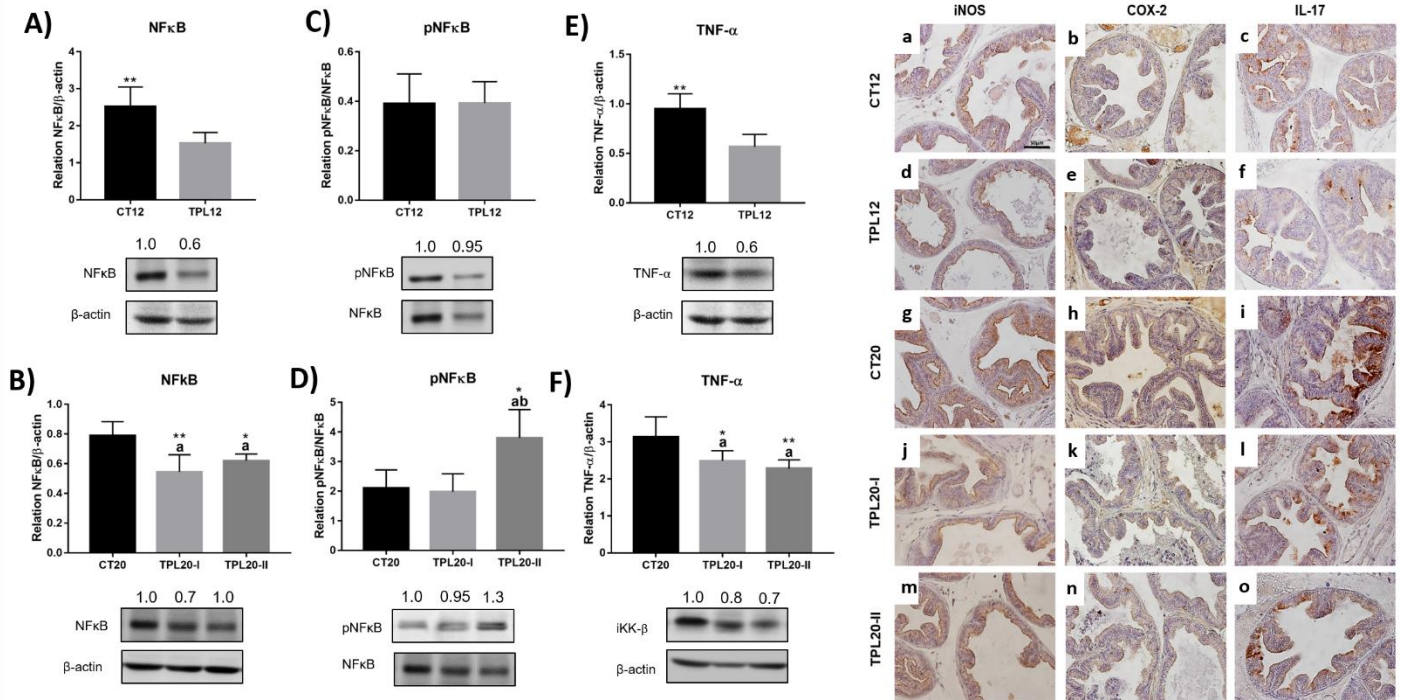
**Figure 6.** Morphological measurements for TRAMP model in early-stage of cancer progression. On the right side, photomicrographs of main tissue findings in the CT12 (A) and TPL12 groups (C) – 40X, Hematoxylin and Eosin – and PCNA immunostaining of the CT12 (B) and TPL12 groups (D) – 40x, Hematoxylin counterstaining. Under morphological results, graph of relative frequency of the PCNA immunostaining and Western blotting representative bands of the protein levels with respective fold-change related to control (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ).



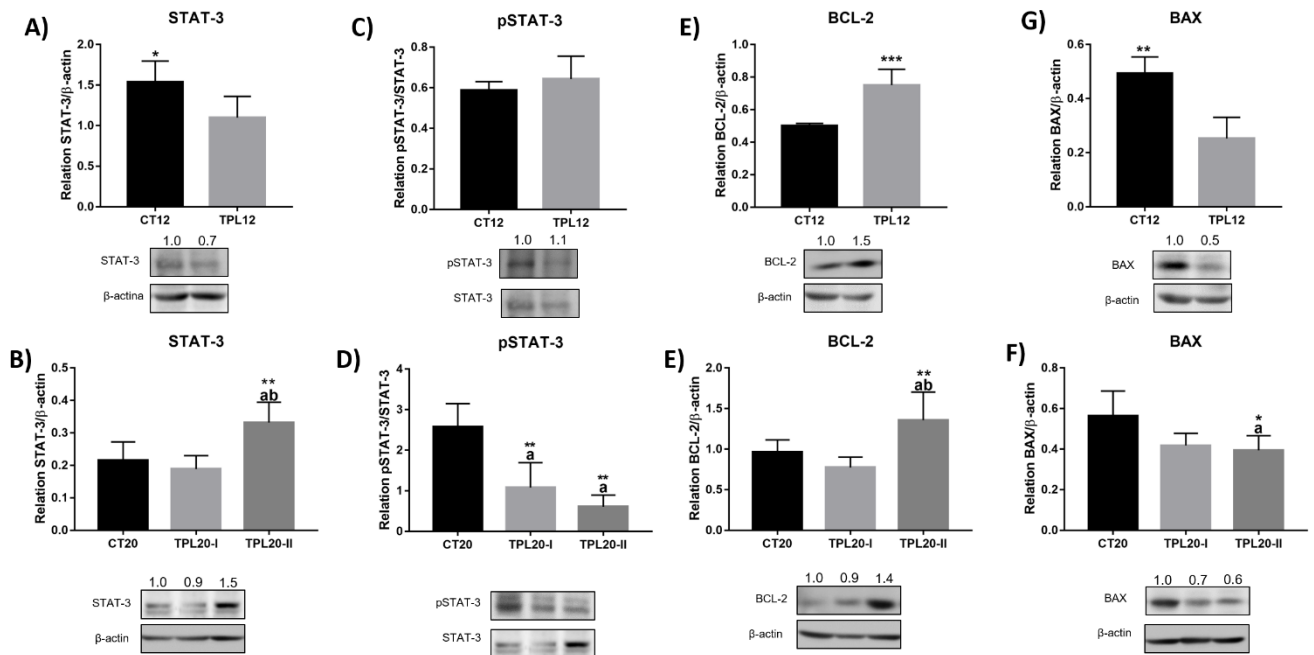
**Figure 7.** Morphological measurements for TRAMP model in late-stage of cancer progression. Below the graphs, photomicrographs of main tissue findings of the CT20 (A), TPL20-I groups (C) and TPL20-II (E) – 40X, Hematoxylin and Eosin – and PCNA immunostaining for CT20 (B), TPL20-I (D) and TPL20-II (F) – 40x, Hematoxylin counterstaining. On the right side, incidence rate of undifferentiated adenocarcinoma and distribution per lobe in late-stage of progression (VL: Ventral lobe, LDL: Dorsolateral lobe, AL: anterior lobe). In the right square, relative frequency for PCNA immunostaining and Western blotting representative bands for AR protein levels with respective fold-change related to control. For CT20, TPL20-I and TPL20-II, letter “a” denotes statistical significance when compared to CT20 group and letter “b” denotes statistical significance when compared to TPL20-I group (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ).



**Figure 8.** TRAMP model protein levels in early and late-stage of cancer progression, representative bands of protein blots and the respective fold-change related to control. For CT12 and TPL12, statistical significance was considered between the treated and non-treated group (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ). For CT20, TPL20-I and TPL20-II, letter “a” denotes statistical significance when compared to CT20 group and letter “b” denotes statistical significance when compared to TPL20-I group (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $< 0,0001$ ).



**Figure 9.** TRAMP model protein levels in early and late-stage of cancer progression, representative bands of protein blots and the respective fold-change related to control. For CT12 and TPL12, statistical significance was considered between the treated and non-treated group (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ). For CT20, TPL20-I and TPL20-II, letter “a” denotes statistical significance when compared to CT20 group and letter “b” denotes statistical significance when compared to TPL20-I group (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ). On the right side, photomicrographs of iNOS, COX-2 and IL-17 for each one of the groups (40x, hematoxylin counterstaining).



**Figure 10.** TRAMP model protein levels in early and late-stage of cancer progression, representative bands of protein blots and the respective fold-change related to control. For CT12 and TPL12, statistical significance was considered between the treated and non-treated group (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ). For CT20, TPL20-I and TPL20-II, letter “a” denotes statistical significance when compared to CT20 group and letter “b” denotes statistical significance when compared to TPL20-I group (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL – ARTIGO I

### 1. MATERIAL AND METHODS

#### 1.1. Considerations for histopathological analysis

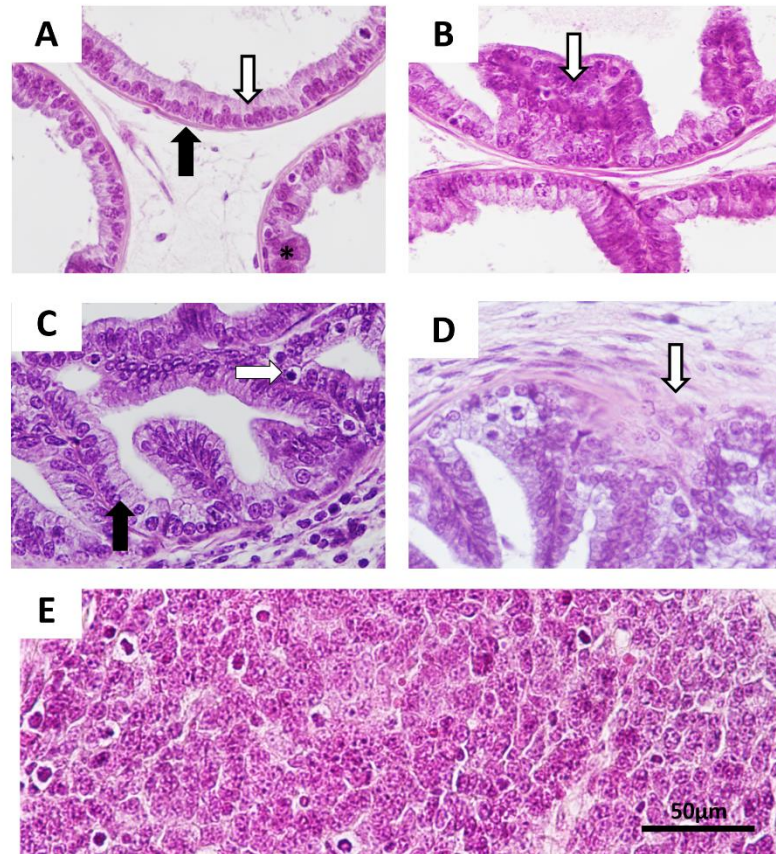
As described in item 2.4. of main file, histopathological analysis of the prostate tissue was performed by capturing 10 random fields (40X objective) of the ventral prostate lobe per animal. The photomicrographs were divided into four quadrants. In each quadrant, prostate tissue was classified according to the morphological observations: Healthy epithelium (HE), Low Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia (LGPIN), High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia (HGPIN), Well Differentiated Adenocarcinoma (WDA), Undifferentiated Adenocarcinoma (UA). Here we describe detailed criteria of classification of morphological findings (Table 1 and Figure 1).

**Table 1. Detailed description of morphological findings and classifications for prostate ventral lobe. Based on Berman-Booty et al. [20] and Gringrich et al. [21]**

<p><b>Healthy epithelium (HE)</b> <b>Fig.3 (A)</b></p>	<p>Monolayers of epithelial cells with morphology distributed from cuboidal to columnar shape, with basally oriented round nuclei (white arrow), surrounded by three to four layers of fibromuscular stroma (black arrow). In the epithelial monolayer, pleating of cells can be found (asterisk).</p>
<p><b>Low Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia (LGPIN)</b> <b>Fig.3 (B)</b></p>	<p>Possible agglomeration and stratification of epithelial cells. Elongated nuclei, with condensed chromatin. There may be short and occasional papillary projections of hyperplastic epithelium into the glandular lumen in the ventral lobe (white arrow).</p>
<p><b>High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia (HGPIN)</b> <b>Fig.3 (C)</b></p>	<p>Increasing variability in nuclear form, condensed chromatin, and apoptotic bodies. Increased epithelial stratification and evident papillary projections to the</p>



	lumen, characterizing cribriform structures (black arrows). There is no evidence of invasion or metastasis.
<b>Well-differentiated adenocarcinoma (WDA) Fig.3 (D)</b>	Epithelial cells with nuclear and cytoplasmic atypia and evidence of mitosis. Stromal invasion, characterized by epithelial cells crossing the basement membrane (white arrow).
<b>Undifferentiated adenocarcinoma (UA) Fig.3 (E)</b>	Widely variable nuclear form, aggregated chromatin; cell sheets with little or no glandular formation



**Figure 1.** Representative photomicrographs of morphological tissue findings for histopathological classification of prostate lesions in TRAMP model. (A) Healthy epithelium from 12-weeks-old mice. (B) LGPIN from 12-weeks-old mice. (C) HGPIN from 20 weeks-old- TRAMP mice. (D) Well-differentiated adenocarcinoma from 20 weeks-old- TRAMP mice. (E) Undifferentiated adenocarcinoma from 20 weeks-old- TRAMP mice. (40X, Hematoxylin and Eosin).

## 1.2. Antibodies for immunohistochemistry and Western blotting analysis

As described in item 2.6 and 2.7 of main file, we present the list of antibodies used for immunohistochemistry and Western analysis (Table 2).

**Tabela 2. Antibodies for Western Blotting (WB) and Imunohistochemistry (IHC)**

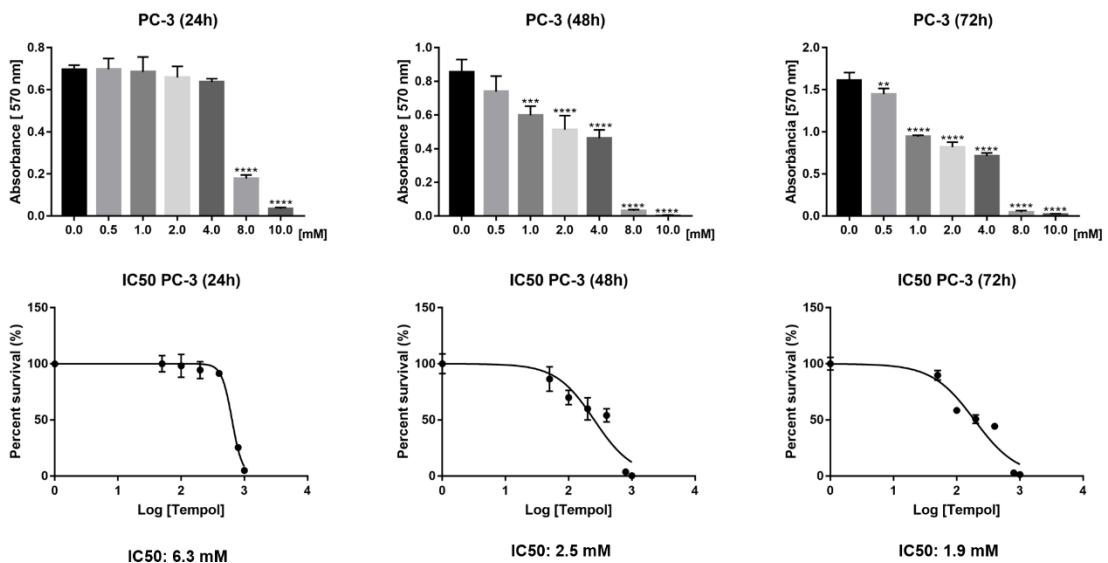
<b>Antibody</b>	<b>Classification</b>	<b>Reference</b>	<b>Range dilution</b>
Anti-mouse	Secondary	W4021, Promega Corporation	1:2000 - 1:5000 (WB)
Anti-rabbit	Secondary	W4018, Promega Corporation	1:2000 - 1:6000 (WB)
AR	Primary	sc-7305, Santa Cruz Biotechnology	1:350 (WB)
BAX	Primary	ab32503, Abcam	1:250 (WB)
BCL-2	Primary	CS3869, Cell Signalling	1:250 (WB)
Caspase-3	Primary	NB100-56113, NovusBio	1:500 (WB)/1:50 (IHC)
COX-2	Primary	sc376861, Santa Cruz Biotechnology	1:500 (WB)/ 1:50 (IHC)
iKB- $\alpha$	Primary	ab32518, Abcam	1:500 (WB)
iKB- $\beta$	Primary	ab7547, Abcam	1:500 (WB)
IL-17	Primary	ab79056, Abcam	1:350 (WB)
iNOS	Primary	ab136918, Abcam	1:500 (WB)/ 1:50 (IHC)
MyD88	Primary	BS147R, Bioss Antibodies	1:350 (WB)
NF $\kappa$ B	Primary	ab13594, Abcam	1:500 (WB)
PCNA	Primary	ab29, Abcam	1:350 (WB)/ 1:300 (IHC)
pNF $\kappa$ B	Primary	93H1, Cell Signaling	1:500 (WB)
STAT-3	Primary	sc7179, Santa Cruz Biotechnology	1:500 (WB)
TLR2	Primary	BS1019R, Bioss Antibodies	1:250 (WB)
TLR4	Primary	sc16240, Santa Cruz Biotechnology	1:250 (WB)/1:50 (IHC)
TNF- $\alpha$	Primary	ab8348, Abcam	1:1000 (WB)
$\beta$ -actina	Primary	ab8227, Abcam	1:5000 (WB)



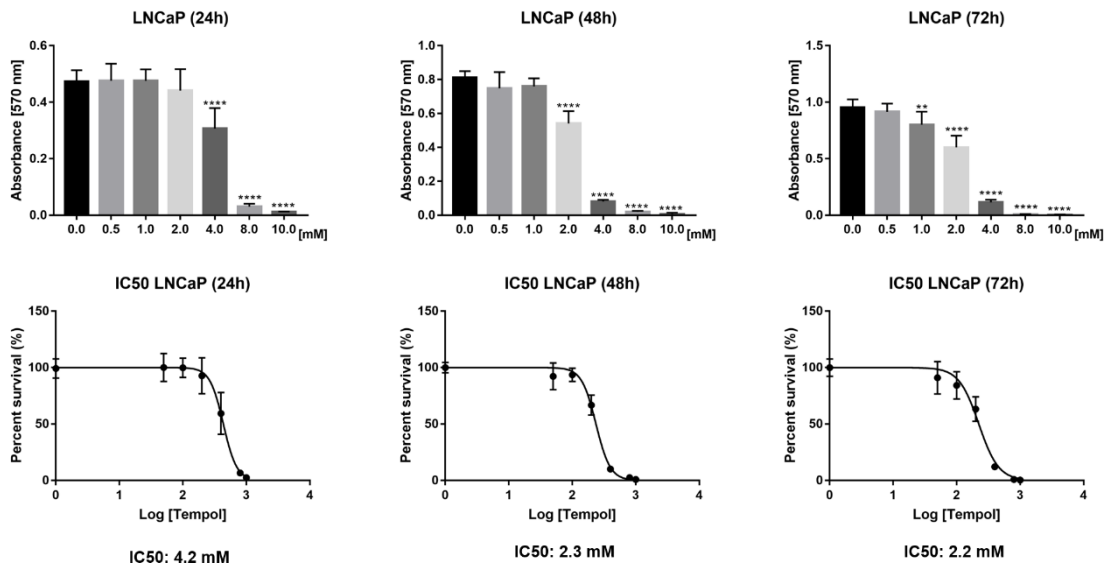
## 2. RESULTS

### 2.1. Screening of tempol doses for PC3 and LNCaP treatment

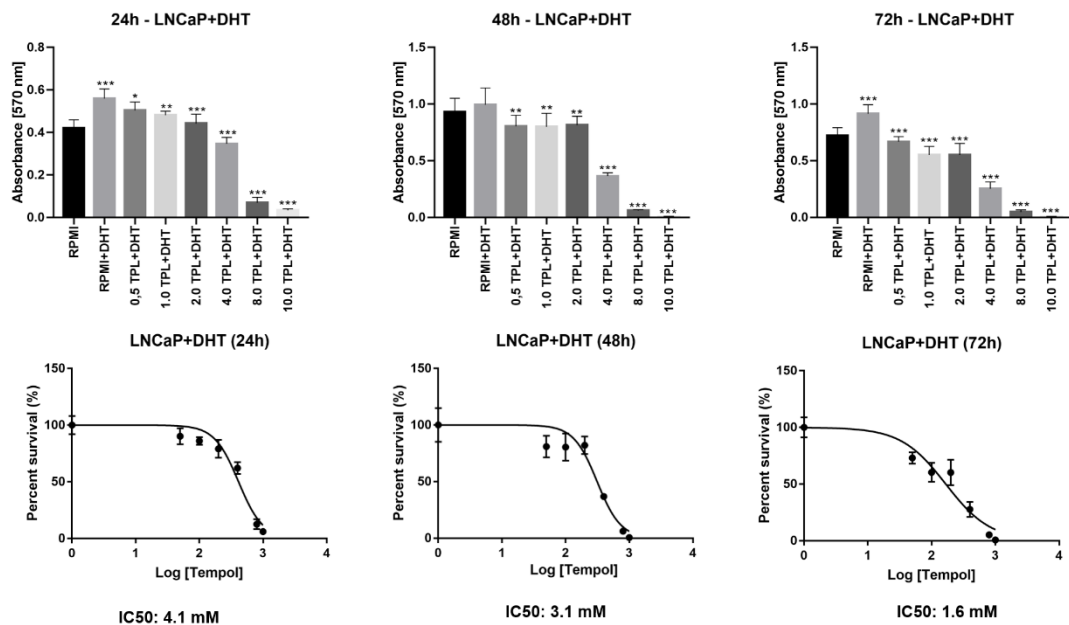
As described in the item 2.2 (Determination of cell viability – Material and methods),  $IC_{50}$  was calculated based on the MTT data. For subsequent analyses, one dose was chosen according to two conditions: [1] the dose must have presented statistical significance by ANOVA-One-Way test, post-Dunnet test; and [2] the dose must be lower than pointed in  $IC_{50}$ . The lowest dose to meet both criteria in cell lines was found at 48h of exposure to tempol, 1mM for PC-3 and 2mM for LNCaP. Here we detail the screening of tempol doses for PC3, LNCaP, and LNCaP+DHT (10 nM) treatment (Figure 2, 3 and 4). The DHT dose for LNCaP treatment in association to tempol was based on Thomas and Sharifi <sup>17</sup>.



**Figure 2.** Absorbance analysis graphs for the MTT assay and  $IC_{50}$  curve generated from the analysis of cell viability data for PC-3. The treatment of the PC-3 cell line occurred at concentrations of 0 (or Control), 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 and 10.0 mM of Tempol in the culture medium, during 24, 48 and 72h of exposition. In A, B and C, statistical significance was given by comparison with the Control column (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). In a, b and c, there is a reduction in  $IC_{50}$  values over time.  $IC_{50}$  curves were only considered with  $R^2 > 0.8$ .



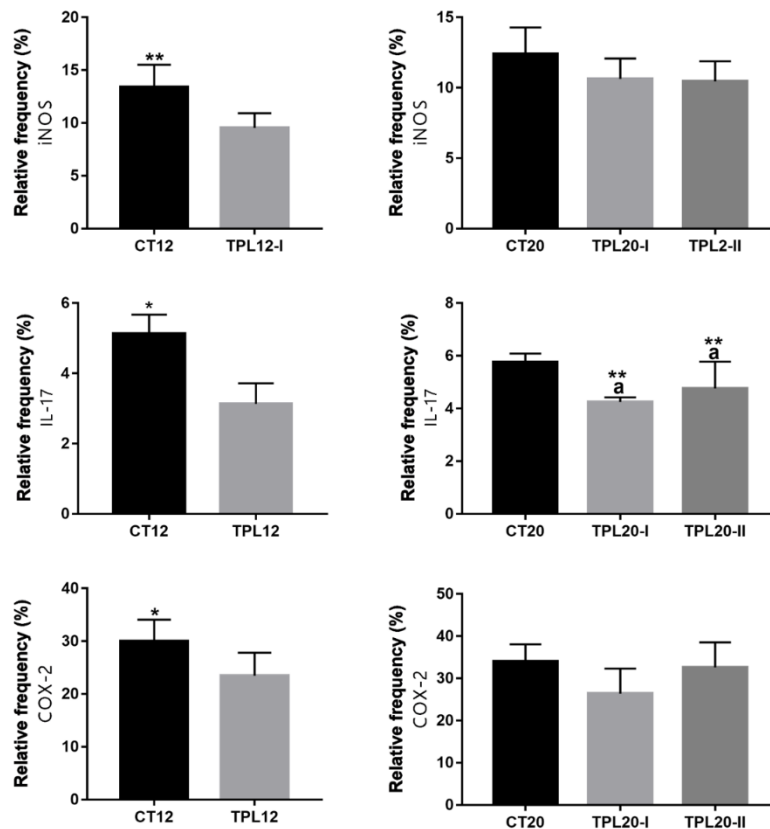
**Figure 3.** Absorbance analysis graphs for the MTT assay and IC<sub>50</sub> curve generated from the analysis of cell viability data for LNCaP. The treatment of the LNCaP cell line occurred at concentrations of 0 (or Control), 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 and 10.0 mM of Tempol in the culture medium, during 24, 48 and 72h of exposition. In A, B and C, statistical significance was given by comparison with the Control column (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001). In a, b and c, there is a reduction in IC<sub>50</sub> values over time. IC<sub>50</sub> curves were only considered with R<sup>2</sup> > 0.8.



**Figure 4.** Absorbance analysis graphs for the MTT assay and IC<sub>50</sub> curve generated from the analysis of cell viability data for LNCaP + DHT (10nM). The treatment of the LNCaP cell line occurred at concentrations of 0 (or Control), 0 + DHT, 0.5 + DHT, 1.0 + DHT, 2.0 + DHT, 4.0 + DHT, 8.0 + DHT and 10.0 mM + DHT of Tempol in the culture medium, during 24, 48 and 72h of exposition. In A, B and C, statistical significance was given by comparison with the RPMI + DHT column (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001). In a, b and c, there is a reduction in IC<sub>50</sub> values over time. IC<sub>50</sub> curves were only considered with R<sup>2</sup> > 0.8.

## 2.2. Immunohistochemical measurements for Early and Late-stage of cancer progression in TRAMP model

In the item 3.7 of main file (*In vivo*, tempol also downregulated levels of inflammatory markers for early and late-stage, Results) we presented the figures of inflammatory markers immunostaining for iNOS, COX-2 and IL-17. Here, we detailed the results with measurements for Early and Late-stage of cancer progression in TRAMP model (Fig.4).



**Figure 5.** Graphs of the quantitative analysis for inflammatory markers iNOS, COX-2 and IL-17 immunostaining for Early and Late-stage of cancer progression in TRAMP model. For CT12 and TPL12, statistical significance was considered between the treated and non-treated group (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ). For CT20, TPL20-I and TPL20-II, letter “a” denotes statistical significance when compared to CT20 group and letter “b” denotes statistical significance when compared to TPL20-I group (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ).

## **B. ARTIGO CIENTÍFICO II**

*Tempol effect on oxidative stress and mitochondrial markers in preclinical models for prostate cancer*

*Running title: Tempol on oxidative and mitochondrial markers*

Paper under review in Toxicology Research

Isabela Rossetto<sup>a</sup>; Felipe Santos<sup>a</sup>; Heloína, Silva<sup>a</sup>; Elaine, Minatel<sup>a</sup>; Mariana, Mesquita<sup>b</sup>,  
Marcos, Salvador<sup>b</sup>, Fábio, Montico<sup>a</sup>; Valéria, Cagnon<sup>a</sup>

(a) Department of Structural and Functional Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

(b) Department of Plant Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Keywords: prostate cancer, oxidative stress, mitochondria, tempol, TRAMP, PC-3 and LNCaP

## ABSTRACT

Tempol is a redox-cycling nitroxide considered a potent antioxidant. The present study investigated the tempol effects on oxidative stress parameters and mitochondrial markers on prostate cancer (PCa). PC-3 and LnCaP cells were exposed to tempol doses. Cell viability test, western blot and Amplex Red analyses were performed. *In vivo*, five experimental groups evaluated tempol effects in the early (CT12 and TPL12 groups) and late stages (CT20, TPL20-I, and TPL20-II) of PCa development. The TPL groups were treated with 50 or 100 mg/kg tempol doses. Control groups received water as the vehicle. The ventral lobe of the prostate and the blood were collected and submitted to western blotting or enzymatic activities analyses. *In vitro*, tempol decreased cell viability and differentially altered the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content for PC-3 and LNCaP. Tempol increased SOD2 levels in both cell lines and did not alter Catalase protein levels. *In vivo*, tempol increased SOD2 levels in the early stage and did not change Catalase levels in the different PCa stages. Systemically, tempol decreased SOD2 levels in the late-stage and improved redox status in the early and late stages, which was confirmed by reduced LDH in tempol groups. Alterations on energetic metabolism and oxidative phosphorylation were observed in TRAMP model. In conclusion, tempol can be considered a beneficial therapy for PCa treatment considering its antioxidant properties, however the PCa progression must be evaluated to get successful therapy.

## INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) accounts for 29% of cancer diagnoses in 2023<sup>1</sup>. This issue is the most common non-cutaneous malignancy and the second most common cause of death among men in the United States and Brazil<sup>1,2</sup>. Several authors have focused the role of oxidative stress in PCa pathogenesis<sup>3,4,5</sup>. Tumor development and progression are complex due to dual role of reactive oxygen species (ROS)<sup>3</sup>. Studies indicates that oxidative stress and prostate cancer can be modulated by antioxidant agents or dietary components rich in antioxidants<sup>4,6</sup>. Therefore, the interest in the role of oxidative stress in cancer has focused on drugs which prevent the ROS generation or enhance their metabolism<sup>7</sup>.

Taking into consideration the above aspects, tempol (4-hydroxy-TEMPO) is a redox-cycling nitroxide, which is considered a potent antioxidant and participates in the metabolism of many ROS<sup>7</sup>. It is a low-toxicity ampholyte compound with a high capacity to permeate cell membranes, the gastrointestinal tract, or the blood-brain barrier<sup>8</sup>. Tempol applications have been studied over the years in animal injuries associated with increased ROS production, such as cancer<sup>7</sup>. It is known that tempol has a great capacity of reaction with superoxide anion to form hydrogen peroxide, being considered a “superoxide dismutase (SOD) mimetic”<sup>7</sup>. In addition, studies demonstrated tempol as a catalase-like agent, being better called as redox-cycling agent<sup>8,9</sup>. A series of tempol functions have been reported in the literature, including preserving mitochondria against oxidative damage, improving tissue oxygenation<sup>10,11</sup> playing a neuroprotective role<sup>12</sup>, protecting normal cells from radiation while maintaining radiation sensitivity of tumor cells<sup>13</sup>, and decreasing spontaneous tumor formation<sup>14</sup>.

Some studies demonstrated the tempol importance as an adjuvant therapy in several cancers pointing to this nitroxide as a therapeutic strategy in association with other anticancer drugs<sup>13,14,15</sup>. But, despite tempol applications in cancer, few studies have reported its use in PCa. Nowadays, our research group demonstrated for the first time tempol differential effects on the PCa inflammation and concluded that tempol actions were different depending on the degree of the prostatic lesion and hormone reliance, indicating the multifaceted role of tempol in the prostatic tissue environment<sup>16</sup>. However, none of the studies in the literature have explored tempol effects on oxidative stress parameters in PCa<sup>16,17,18</sup>.

As proposed by Rossetto et al.<sup>16</sup>, the present study considers the differential responses of PCa cell lines with distinct androgen reliance PC-3 and LNCaP, the most common cell models used to understand prostate tumoral behavior<sup>19</sup>. We also evaluated the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model in the early and late stages of cancer progression. Regarding *in vivo* studies, the TRAMP model is considered a good alternative for

studying PCa progression and chemoprevention approaches, with well-established cancer stages from 8 to 30 weeks of age<sup>20, 21, 22</sup>. In this way, the aim of this study was to evaluate tempol role on PCa, focusing on the oxidative stress markers and mitochondrial parameters considered the major source of ROS.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Cell culture and reagents**

PCa cell lines, PC-3 and LNCaP, were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and the Rio de Janeiro Cell Bank (Rio de Janeiro, SP, Brazil), respectively. Cultivation of both cell lines was performed in RPMI-1640 medium (Vitrocell, SP, Brazil) at a temperature of 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> environment. The growth medium was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Vitrocell, SP, Brazil) and 1% penicillin/streptomycin (Vitrocell, SP, Brazil). For experimental purposes, tempol (4-hydroxy-TEMPO, 176141, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was directly dissolved in the medium at varying concentrations.

### **Determination of cell viability**

The cells (LNCaP,  $3.5 \times 10^4$ ; PC-3,  $3 \times 10^4$ ) were plated in 12-well plates in triplicate and allowed to attach by overnight incubation. Cells were treated with or without tempol diluted in the medium (0.5, 1, 2 mM) for 24, 48, and 72 h. At the end of the treatment, the cells were collected by trypsinization and suspended in 0.1% trypan blue solution (Sigma-aldrich, T8154, St. Louis, MO, USA). Live cells were counted using a Neubauer chamber.

### ***In vitro* detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

The Amplex® Red assay kit (Molecular Probes, Life Technologies, California, USA) was employed to quantify H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, following the manufacturer's guidelines. Cells were maintained at a temperature of 37°C in Krebs Ringer solution and loaded with the Amplex Red probe (50µM) along with horseradish peroxidase (0.1 U/mL) for a duration of 30 minutes. Subsequently, a 100 µL aliquot of the medium was collected, and fluorescence intensity was measured at an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm using a Multi-Mode Microplate Reader Model Synergy H1M equipment (Bio-Tek instruments). Incorporated into the experimental design were positive and negative control setups. The positive control involved the use of 20 µL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a buffer solution, while the negative control exclusively employed the buffer solution. The experimental procedure was meticulously conducted in triplicate, encompassing both technical and biological replicates.

## **Animals and experimental procedures**

In this study we used the same animal cohort from our previous report addressing tempol effects on TRAMP mice ventral prostate (Rossetto et al., 2022). The total of 50 male TRAMP mice (*Mus musculus* - C57BL/6-Tg(TRAMP)8247Ng/J X FVB/NJ)F1/J) were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation at the State University of Campinas (CEMIB/UNICAMP). They were subsequently categorized into five distinct experimental groups (n=10) with the intention of assessing the effects of tempol at different stages of prostate cancer progression: early (CT12 and TPL12 groups) and late stages (CT20, TPL20-I, and TLP20-II).

The treatment protocol for the TPL groups was performed by the administration of tempol at doses of 50 mg/kg or 100 mg/kg (4-Hydroxy-TEMPO, 97%, Sigma-Aldrich - 176141), diluted in water. These doses were administered five times a week during four weeks. Following the treatment period, the animals were euthanized, and their ventral prostate lobes were subjected to various analytical procedures. The experimental protocol followed the ethical standards stipulated by the Ethics Committee in the Use of Animals (CEUA 5115-1/2019, 5115-1(A)-2020).

### **Western Blot analysis**

#### *Sample preparation*

For the *in vitro* analysis, PC-3 cells ( $3 \times 10^5$ ) and LNCaP cells ( $4 \times 10^5$ ) were seeded onto 60mm<sup>2</sup> plates and incubated overnight for attach. Subsequently, the plates were subjected to treatment either with or without tempol, according to designated doses for each cell line. Following the designated tempol treatment periods, namely 48 hours and 72 hours, the samples were harvested and subjected to protein extraction process. The experimental protocol was rigorously executed using three separate passages for each cell line. The experimental design was performed into technical and biological triplicates, thereby ensuring robust and reliable results. The tempol dosage employed for the treatment of PC-3 and LNCaP cells adhered to the pre-established proposition presented by Rossetto et al., 2022.

For the *in vivo* analysis, samples of the prostatic tissue (ventral lobe) were collected from a total of 5 animals from respective experimental group. These prostatic tissue samples were subsequently subjected to protein extraction procedure, with subsequent electrophoresis. These steps followed protocols described by Rossetto et al., 2022.

#### *In vivo serum dosages*



### **LDH**

The estimation of serum LDH levels was performed utilizing a Labtest commercial kit. Through a kinetic system, the interconversion of pyruvate and lactate catalyzed by LDH in the presence of NADH is measured based on the reduction of the absorbance at 340nm (spectrometer reader Synergy™ 2, BioTek® Instruments, Inc., USA coupled with software Gen5™ 2.0), proportional to the LDH activity in the sample. The results were expressed as U/L.

### **Catalase (CAT):**

The activity of CAT was determined following Hadwan & Abed (2016) protocol (adapted to microplate). Optical density was measured at 374 nm in a reader (Synergy™ 2, BioTek® Instruments, Inc., USA), coupled with software Gen5™ 2.0. The measure of CAT activity was expressed in kU.

### **Superoxide Dismutase (SOD):**

The total SOD activity was performed by colorimetric method utilizing a Elabscience commercial kit. In a xanthine and xanthine oxidase system, the Superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) produced oxide hydroxylamine to form nitrite (chromogenic factor). The SOD content is mensurate based on the capacity of inhibitory effect on  $O_2^{\cdot-}$ . The absorbance was measured spectrophotometrically at 550 nm (spectrometer reader Synergy™ 2, BioTek® Instruments, Inc., USA coupled with software Gen5™ 2.0) and the results were expressed as U/mL.

### **GSH/GSSG:**

Both forms of glutathione, reduced and oxidized, were determined according to Rahman et al., 2006. Based on the reaction of GSH with 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) which results in 5'-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) and oxidized glutathione-TNB adduct (GS-TNB). The reaction was performed in 96 wells microplate and measured spectrophotometrically at 412 nm (spectrometer reader Synergy™ 2, BioTek® Instruments, Inc., USA coupled with software Gen5™ 2.0). GSSG was calculated by the rate of formation of 2-nitro-5-thiobenzoic acid compared to the standard curve of GSSG, and the GSH as total values of glutathione – GSSG. The results of GSH/GSSG rate are expressed as  $\mu\text{mol/L}$ .

### **Statistical analysis**

All data was previously considered parametric after Shapiro-Wilk's Test. The statistical analysis was performed using GraphPad Prism with the level of significance set at 5% (version 7.00).

*In vitro* analysis: Control and Tempol groups were compared through Student's T Test for the chosen time points. For the cell viability tests, ANOVA-One-way was followed by Dunnett's Multiple Comparison test.

*In vivo* analysis: Student's T Test was performed for early-stage analysis. ANOVA-One-Way followed by Tukey's test was performed for late-stage analysis.

## RESULTS

### Tempol treatment decreased cell viability

PC-3 cells showed sensitivity to tempol treatment since 24 h of exposure, with decreased cell viability for all the tested doses (Fig. 1 A). These cells became more sensitive to tempol concentrations over time, leading to significant inhibition after 48 h and 72 h (Fig. 1 B and C).

In contrast, LNCaP cells showed lower sensitivity to tempol treatment in 24 h of exposure, with significant decrease in cell viability only for 2mM of treatment (Fig. 1 D). These cells also became more sensitive to tempol concentrations over time, leading to significant inhibition after 48 h and 72 h for all the evaluated doses (Fig. 1 E and F).

The results suggest that tempol action might be time-dependent and also that the efficacy of tempol may be related to the androgen responsiveness of human PCa cells.

### Tempol differentially altered H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in human cell lines

Tempol treatment after 48 and 72 h differentially changed the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in PC-3 and LNCaP cells.

In the PC-3 cells, tempol increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cellular content after 48 and 72h of exposure (Fig. 2 A). In contrast, in the LNCaP cells tempol decreased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cellular content after 48 and 72h of exposure (Fig. 2 B).

### Tempol altered oxidative stress markers in the PC-3 and LNCaP cells

In the PC-3 and LNCaP cells, tempol treatment increased SOD2 protein levels after 48h and 72h of exposure (Fig.3 A and C). In the same way, tempol did not show effects on the Catalase protein levels for both cell lines (Fig.3 B and D).

Interestingly, in the LNCaP cells tempol decreased protein levels of the product of lipid peroxidation, 4-HNE. Furthermore, tempol did not alter 4-HNE levels in PC-3 (Fig. 3 E and F).

### **Tempol altered oxidative stress tissue markers in early and late-stages of CaP progression**

As observed in the human cell lines, tempol treatment increased levels of SOD2. However, this increase in SOD2 just occurred in the early-stage of cancer progression (Fig. 4 A). In the late-stage, no significant alterations of SOD2 protein levels were observed (Fig. 4 C). Also, as observed in the cell lines, tempol did not alter Catalase protein levels neither in early nor in late-stage (Fig 4. B and D).

In addition, increased 4-HNE was verified only in the TPL20-II group after tempol treatment (Fig 4 E and F).

### **Tempol effects in systemic markers for oxidative stress and tissue injury**

Tempol exerted systemic effects in TRAMP model in the early and late stages of cancer progression. Tempol did not alter SOD2 systemic levels in the early-stage (Fig. 5 A), but it possibly interfered in SOD2 decrease after treatment with doses I and II in the late-stage (Fig. 5 B). Once more, tempol did not interfere in Catalase levels in both cancer stages, even systemically (Fig. 5 C and D).

Even though tempol did not show relevant alterations in SOD2 and Catalase enzymes, it improved the redox status *in vivo* in the early and the late stages of cancer progression. This fact can be suggested by the increase in the GSH/GSSG ratio in all the groups after tempol treatment (Fig. 5 G and H). The tissue damage, pointed by lactate dehydrogenase (LDH) levels in serum, was found reduced in the TPL12, TPL20-I and TPL20-II groups (Fig 5 E and F).

### **Tempol effects indicated alterations on energetic metabolism and oxidative phosphorylation in TRAMP model**

In the early stage, tempol increased PGC-1 $\alpha$  (Fig 6 F) and modulated some complexes of OXPHOS, as decreasing CV (Fig 6 A) and increasing CI (Fig 6 E). The other complexes did not show tempol interference (Fig 6 B, C, D).

Tempol significantly decreased PGC-1 $\alpha$  (Fig 7 F) in both doses of treatment in the late stage, presenting TPL20-II levels even lower than TPL20-I for this marker. Tempol positively modulated almost all the OXPHOS complexes in the late stage (Fig 7 A, B, C and D), except CI (Fig 7 E).

## **DISCUSSION**

The imbalance of oxidative system enzymes and ROS is a fundamental factor in PCa ethiology<sup>24</sup>. The production rate of reactive oxygen species in cancer exceeds the capacity of endogenous neutralizing enzymes<sup>25</sup>. The results herein indicated molecular alterations in some

oxidative marker signaling not only *in vitro*, in PC-3 and LNCaP tumor cells, but also *in vivo*, in the early and late stages of TRAMP model cancer progression. It is the first time that the relationship between different oxidative stress enzymes and tempol applications is studied in a PCa preclinical TRAMP model, highlighting this nitroxide local and systemic influence.

Tempol treatment decreased cellular viability in the PC-3 and LNCaP cell lines, suggesting a reduction in tumoral proliferation by means of the Trypan Blue experiment in the study herein. A previous study by Rossetto et al.<sup>16</sup> reported a decrease in cell viability after tempol treatment and proposed an optimal tempol dose for PC-3 and LNCaP treatments. Rossetto et al.<sup>16</sup> also suggested that the sensitivity to tempol could be directly linked to the androgen independence or dependence of the PC-3 and LNCaP cells. In agreement with the present study, it was verified that tempol differentially altered H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in the cell lines. This differential cell behavior suggests the correlation of tempol efficacy with the androgen reliance of human PCa cells once more. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is an important ROS, which is considered to be a neutral molecule and the result of superoxide anion (O<sup>2-</sup>) neutralization by superoxide dismutase (SOD)<sup>26</sup>. After SOD action, the formed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is degraded by Catalase in H<sub>2</sub>O and O<sub>2</sub><sup>27, 28</sup>. One of main tempol actions is its capability of reacting with O<sup>2-</sup> to form H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, accounting for its “SOD mimetic” attribute. In addition, studies also reported tempol as a catalase-like agent<sup>7</sup>. The changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in the cell lines after tempol treatment, which were observed in the results herein, can be linked to the oxidative stress markers in the PC-3 and LNCaP cell lines. For PC-3, tempol treatment at 1mM during 48 and 72h was able to neutralize the existing O<sup>2-</sup> in the cell and it was also able to induce higher SOD2 levels, forming high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents. Despite the superoxide anion neutralization, tempol did not change catalase levels and did not act like a catalase-agent factor. As a consequence, the results indirectly showed that tempol did not decrease the 4-HNE levels for PC-3. 4-HNE is a highly toxic and most abundant stable end product of lipid peroxidation and has also been involved in tissue damage; dysfunction; injury associated with aging; and other pathological conditions such as cancer<sup>29</sup>. According to Breitzig et al.<sup>30</sup>, elevated ROS levels serve as a marker for oxidative stress and are associated with lipid peroxidation and an imbalance of the redox system. Not only are they inevitable products of oxidative stress, but they are also secondary intermediates such as 4-HNE or malondialdehyde (MDA). As a product of lipid peroxidation, 4-HNE is also considered an oxidative stress biomarker.<sup>30</sup>

For LNCaP cells, the results showed that tempol treatment at 2mM during 48 and 72h was able to neutralize the existing O<sup>2-</sup>. As the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cellular contents decreased after tempol administration, we concluded that, once catalase levels did not change, tempol also acted as a

catalase-agent. Additional confirmation of that consists in the reduction of 4-HNE levels for LNCaP. In conclusion, tempol decreased the oxidative imbalance for LNCaP, more effectively than for PC-3, considering the used dosages.

Interestingly, tempol treatment induced a SOD2 level increase in the early-stage of cancer progression *in vivo*. This SOD2 level increase was already previously reported by Hermes et al.<sup>31</sup> in the diaphragm of mdx mice after tempol use. SOD2 expression is commonly downregulated in cancer cells, and SOD2 activity restoration via SOD2 overexpression significantly inhibits *in vitro* and *in vivo* tumor growth, including PCa growth<sup>32</sup>. SOD2 levels progressively decline during the transition from prostatic intraepithelial neoplasia to androgen-dependent PCa then to castration-resistant PCa<sup>33,34</sup>. Thomas and Sharifi<sup>18</sup> demonstrated for the first time that SOD mimetics, considering their ability to suppress AR function, may be beneficial to treat the currently incurable castration-resistant PCa, in which SOD2 expression is highly suppressed. Taking into consideration the TRAMP model, the present study highlights that tempol acts mainly in the early-stage of cancer progression in the prostate tissue, and was able to increase the SOD2 levels. In agreement with this result, Rossetto et al.<sup>16</sup> demonstrated AR protein level reduction in the early-stage of CaP. In the late-cancer stage, AR level reduction was observed only in the TPL20-II group 16. However, this present study did not report significant SOD2 alterations in the prostate tissue in the late-cancer stage in both tempol doses. On the other hand, the 4-HNE levels increased in the TPL20-II group.

Systemically, tempol treatment reduced SOD2 level in the late-stage of cancer progression in the TRAMP model and there was no alteration in the catalase activity. Also, taking into consideration an overview of all the experimental PCa methodologies studied herein, the results indicated that tempol did not exert any effects around catalase levels either in the prostate or in the plasma. In addition, the results showed that tempol treatment systemic improvement of the TRAMP model, reduced LDH, which is a tissue damage marker. Tempol also led to an improvement in the systemic *redox status*, which could be seen by the reduction in the GSH/GSSH ratio in the treated groups. Tempol also led to *redox status* improvement. This fact could be verified by the GSH/GSSH rate reduction in Tempol groups.

It is the first time in the literature that systemic amelioration is reported in the TRAMP model after tempol treatment and it corroborates with the studies that show tempol's potential as an adjuvant therapy<sup>14</sup>. Ayaz et al.<sup>35</sup> also reported that tempol decreased LDH in the serum of rats during doxorubicin administration. LDH converts pyruvate to lactate, and the aberrant expression and activation of LDH have been shown to be closely related to diverse types of cancer and is thus considered a promising target for cancer prevention and treatment.

GSH/GSSG is the ratio between the reduced glutathione (GSH) and the oxidized glutathione (GSSG) and could be considered an important tumor marker in the serum <sup>36</sup>.

Finally, the present study also analyzed the mitochondrial aspects of PCa after tempol treatment in the TRAMP model. Mitochondria are indispensable for energy metabolism, apoptosis regulation, cell signaling. In addition, mitochondria are considered novel targets for cancer therapy, once inside cancer they are characterized by ROS overproduction <sup>37</sup>. Some studies report that tempol induces apoptosis in a number of tumor cell lines through free radical-dependent mechanisms <sup>38,39</sup>. PGC-1 $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha, is highlighted as a master regulator of mitochondrial biogenesis and function, including oxidative phosphorylation and ROS detoxification <sup>40</sup>. The behavior of PGC-1 $\alpha$  in cancer can vary depending on the type of cancer and the stage of the disease <sup>41</sup>. It justifies the fact that in the present study tempol increased PGC-1 $\alpha$  in the early-cancer stage and decreased it in the late-cancer stage (TPL20-I and -II), indicating that tempol could play a different role, depending on the cancer progression stage and its inherent metabolism.

Some studies suggest that PGC-1 $\alpha$  may have both protective and promoting effects on cancer development and progression. Zhang et al. <sup>42</sup> demonstrated that, at a high expression level, induced by *miR-217* downregulation, the inhibition of PGC-1 $\alpha$  may exert oncogenic modulation on breast cancer. Shiota et al. <sup>43</sup> demonstrated that increased PGC-1 $\alpha$  levels promoted tumor growth in an androgen-dependent subpopulation of cancer cells by activating an androgen receptor and its targets. In androgen-independent cells, PGC-1 $\alpha$  inhibition led to cell cycle arrest in the G1 phase, suppressing tumor growth <sup>44</sup>. Also, Torrano et al. <sup>44</sup> identified PGC-1 $\alpha$  as a tumor suppressor based on the bioinformatic analysis of CaP databases.

The PGC-1 $\alpha$  protein levels can be related to the OXPHOS complex levels <sup>45</sup>. OXPHOS is the acronym for “oxidative phosphorylation” and requires the coordinated transfer of electrons through enzymatic multi-subunits, generating a proton gradient, across the inner mitochondrial membrane <sup>46</sup>. Schöpf et al. <sup>47</sup> reported that, OXPHOS remodeling involves mitochondrial DNA mutations and increased succinate oxidation in advanced PCa. In the early-cancer stage, the OXPHOS response was not so clear, with an increase in Complex I and a decrease in Complex V. This can explain why PGC-1 $\alpha$  increased in this stage after tempol treatment. In this prostate cancer stage, the PGC-1 $\alpha$  increase could represent a response to therapy and a cellular adaptation to new stress conditions.

In the late-cancer stage, OXPHOS and PGC-1 $\alpha$  were both decreased by treatment. The decrease in complexes OXPHOS point to the positive tempol effects on cellular bioenergetics. When there is an increase in energy demand, such as in cancer, PGC-1 $\alpha$  is activated and

promotes a series of adaptive responses, including the stimulation of OXPHOS. It acts by increasing the expression of genes involved in the synthesis and assembly of mitochondrial respiratory chain components, as well as in the regulation of fatty acids and glucose metabolism. Through these mechanisms, PGC-1 $\alpha$  promotes an increase in OXPHOS activity, resulting in a greater capacity for ATP production by the mitochondria<sup>48</sup>. This helps cells meet their energy needs in situations of increased demand or metabolic challenge. The decrease in mitochondrial complexes after tempol treatment suggests a lower energy response to the augmented tumoral demand and a change in mitochondrial metabolism for energy generation.

## **CONCLUSION**

Tempol affected cell viability and oxidative stress parameters of human prostate cancer cell lines. According to the distinct genetic background and hormone reliance of the cells, tempol demonstrated SOD and catalase mimetic actions, confirming its antioxidant and anti-proliferative properties in the tumoral cell lines.

In the TRAMP model, tempol differentially altered the oxidant markers and mitochondrial parameters in the early-and late-stage of cancer progression, emphasizing that tempol has different action depending on the degree of the prostatic lesions. Complementary analyses of mitochondrial parameters demonstrated that at the advanced stage, tempol led to decreased components of OXPHOS and decreased PGC-1 $\alpha$ , preventing the tissue from matching the increased energy demands of the cell at this stage. In addition, these results suggest that the tempol should be considered as a potential therapy that modulates PGC-1 $\alpha$  in tumor progression.

Tempol showed a multifaceted approach in the prostatic tissue environment. Thus, new research will be useful to get more details about tempol actions around PCa angiogenesis and matrix remodeling. Tempol could be a beneficial PCa therapy.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The funding for this study was provided by the São Paulo Research Foundation – FAPESP through grants numbered 2018/21647-6 and 2021/02108-0. Additionally, partial financial support was received from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) under grant number 140699/2019-8. These funding sources have played a crucial role in enabling the successful execution of this research endeavor.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare they have no conflict of interest.

## REFERENCES

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* 2023; 73(1):17-48. doi: 10.3322/caac.21763.
- [2] INCA. Câncer de Próstata. Available in: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>>. Acess: june, 4th, 2023.
- [3] Kalinina EV, Gavriiliuk LA, Pokrovsky VS. Oxidative Stress and Redox-Dependent Signaling in Prostate Cancer. *Biochemistry (Mosc)* 2022; 87(5):413-424. doi: 10.1134/S0006297922050030.
- [4] Tan BL and Norhaizan ME. Oxidative stress, diet and prostate câncer. *World J. Mens Health* 2021; 39: 195-207. doi: 10.5534/wjmh.200014.
- [5] Paschos A, Pandya R, Duivenvoorden WCM, Pinthus JH. Oxidative stress in prostate cancer: changing research concepts towards a novel paradigm for prevention and therapeutics. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2013; 16(3):217-25. doi: 10.1038/pcan.2013.13.
- [6] Lamas CA, Lenquiste SA, Baseggio AM, Cuquetto-Leite L, Kido LA, Aguiar AC, Erbelin MN, Collares-Buzato CB, Maróstica Jr, MR, Cagnon VHA. Jaboticaba extract prevents prediabetes and liver steatosis in high-fat-fed aging mice. *J Funct Foods* 2018; 47:434–46. doi: 10.1016/j.jff.2018.06.005.
- [7] Wilcox, CS. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol Ther* 2010; 126 (2): 119–145. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.01.003
- [8] Wilcox, CS; Pearlman, A. Chemistry and antihypertensive effects of Tempol and other nitroxides. *Pharm Ver* 2008; 60: 418-469. doi: 10.1124/pr.108.000240
- [9] Soule BP, Hyodo F, Matsumoto K, Simone NL, Cook JA, Krishna MC, Mitchell JB. The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radic Biol Med* 2007;42:1632–1650. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.030
- [10] Ahmed, LA; Shehata, NI; Abdelkader, NF; Khattab, MM. Tempol, a superoxide dismutase mimetic agent, ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity through alleviation of mitochondrial dysfunction in mice. *PLoS One* 2014; 9(10):e108889. doi: 10.1371/journal.pone.0108889.
- [11] Silva HNM, Covatti C, Rocha GL, Mizobuti DS, Mâncio RD, Hermes TA, Kido LA, Cagnon VHA, Pereira ECL, Minatel E. Oxidative Stress, inflammation, and activators of mitochondrial biogenesis: Tempol targets in the diaphragm muscle of exercise trained - mdx mice. *Front Physiol* 2021; 12:649793 doi: 10.3389/fphys.2021.649793.



- [12] Spejo AB, Teles CB, Zuccoli GDS, Oliveira ALR. Synapse preservation and decreased glial reactions following ventral root crush (VRC) and treatment with 4-hydroxy-tempo (TEMPOL). *J Neurosci Res* 2019; 97 (4): 520-534, 2019. doi: 10.1002/jnr.24365.
- [13] Ye S; Xu P; Huang M et al. The heterocyclic compound Tempol inhibits the growth of cancer cells by interfering with glutamine metabolism. *Cell Death and Disease* 2020; 11(320). doi.org/10.1038/s41419-020-2499-8.
- [14] Ewees MG; Messiha BAS; Abdel-Bakky MS, Bayoumi AM, Abo-Saif AA. Tempol, a superoxide dismutase mimetic agent, reduces cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Drug Chem Toxicol* 2018; 42(6):657-664. doi: 10.1080/01480545.2018.1485688.
- [15] Zhang Q, Huang Y, Yang R, Mu J, Zhou Z, Sun M. Tempol, a superoxide dismutase mimetic agent, reduces cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Drug Chem Toxicol* 2019; 42(6):657-664. doi: 10.1080/01480545.2018.1485688.
- [16] Rossetto I, Santos F, Kido L, Lamas C, Montico F, Cagnon V. Tempol differential effect on prostate cancer inflammation: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Prostate* 2023; 83(5):403-415. doi: 10.1002/pros.24473.
- [17] Lejeune D, Hasanuzzaman M, Pitcock A, Francis J, Sehgal I. The superoxide scavenger TEMPOL induces urokinase receptor (uPAR) expression in human prostate cancer cells. *Mol Cancer* 2006; 5:21. doi: 10.1186/1476-4598-5-21.
- [18] Thomas R, Sharifi N. SOD mimetics: a novel class of androgen receptor inhibitors that suppresses castration-resistant growth of prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 2012; 11(1):87-97. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0540
- [19] Namekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Application of prostate cancer models for preclinical study: Advantages and limitations of cell lines, patient-derived xenografts, and three-dimensional culture of patient-derived cells. *Cells* 2019; 8(1):74. doi: 10.3390/cells8010074.
- [20] Berman-Booty LD, Sargeant AM, Rosol TJ, Rengel RC, Clinton SK, Chen CS, Kulp SK. A review of the existing grading schemes and a proposal for a modified grading scheme for prostatic lesions in TRAMP mice. *Toxicol Pathol* 2012;40(1):5-17. doi: 10.1177/0192623311425062.
- [21] Gingrich JR, Barrios RJ, Foster BA, Greenberg NM. Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 1999; 2(2):70-75. doi: 10.1038/sj.pcan.4500296.

- [22] Kido LA, Lamas CA, Maróstica MR Jr, Cagnon VHA. Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP) model: A good alternative to study PCa progression and chemoprevention approaches. *Life Sci* 2019; 217:141-147. doi: 10.1016/j.lfs.2018.12.002.
- [23] Hadwan MH, Abed HN. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data Brief* 2015; 6:194-9. doi: 10.1016/j.dib.2015.12.012.
- [24] Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* 2012;142:w13659. doi: 10.4414/smw.2012.13659.
- [25] Salvemini D, Riley DP, Cuzzocrea S. SOD mimetics are coming of age. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(5):367-74. doi: 10.1038/nrd796.
- [26] Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem* 2017; 398(10):1095-1108. doi: 10.1515/hsz-2017-0131.
- [27] Jena AB, Samal RR, Bhol NK, Duttaroy AK. Cellular Red-Ox system in health and disease: The latest update. *Biomed Pharmacother* 2023; 162:114606. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114606.
- [28] Ransy C, Vaz C, Lombès A, Bouillaud F. Use of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to cause oxidative stress, the Catalase issue. *Int J Mol Sci* 2020; 21(23):9149. doi: 10.3390/ijms21239149.
- [29] Shoeb M, Ansari NH, Srivastava SK, Ramana KV. 4-Hydroxynonenal in the pathogenesis and progression of human diseases. *Curr Med Chem* 2014;21(2):230-7. doi: 10.2174/09298673113209990181.
- [30] Breitzig M, Bhimineni C, Lockey R, Kolliputi N. 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress? *Am J Physiol Cell Physiol* 2016; 311(4):C537-C543. doi: 10.1152/ajpcell.00101.2016.
- [31] Hermes TA, Mizobuti DS, da Rocha GL, da Silva HNM, Covatti C, Pereira ECL, Ferretti R, Minatel E. Tempol improves redox status in mdx dystrophic diaphragm muscle. *Int J Exp Pathol* 2020; 101(6):289-297. doi: 10.1111/iep.12376.
- [32] Venkataraman S, Jiang X, Weydert C, Zhang Y, Zhang HJ, Goswami PC, Ritchie JM, Oberley LW, Buettner GR. Manganese superoxide dismutase overexpression inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer cells. *Oncogene* 2005; 24(1):77-89. doi: 10.1038/sj.onc.1208145.
- [33] Bostwick DG, Alexander EE, Singh R, Shan A, Qian J, Santella RM, Oberley LW, Yan T, Zhong W, Jiang X, Oberley TD. Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer* 2000; 89(1):123-34. PMID: 10897009.

- [34] Sharifi N, Hurt EM, Thomas SB, Farrar WL. Effects of manganese superoxide dismutase silencing on androgen receptor function and gene regulation: implications for castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(19):6073-80. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0591.
- [35] Ayaz AS, Bhandari U, Pillai KK. Tempol Ameliorates Oxidative Stress, Apoptosis in Doxorubicin Induced Cardiotoxicity. *Advances in Applied and Pharmaceutical Sciences Journal* 2017; 1(1):24-32. doi:10.26768/AAPSJ.1.1.24-32
- [36] Zitka O, Skalickova S, Gumulec J, Masarik M, Adam V, Hubalek J, Trnkova L, Kruseova J, Eckschlager T, Kizek R. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett* 2012; 4(6):1247-1253. doi: 10.3892/ol.2012.931.
- [37] Yang Y, Karakhanova S, Hartwig W, D'Haese JG, Philippov PP, Werner J, Bazhin AV. Mitochondria and mitochondrial ROS in cancer: novel targets for anticancer therapy. *J Cell Physiol* 2016; 231(12):2570-81. doi: 10.1002/jcp.25349.
- [38] Monti E, Cova D, Guido E, Morelli R, Oliva C. Protective effect of the nitroxide tempol against the cardiotoxicity of adriamycin. *Free Radic Biol Med* 1996;21(4):463-70. doi: 10.1016/0891-5849(96)00124-4.
- [39] Monti E, Supino R, Colleoni M, Costa B, Ravizza R, Gariboldi MB. Nitroxide TEMPOL impairs mitochondrial function and induces apoptosis in HL60 cells. *J Cell Biochem*. 2001;82(2):271-6. doi: 10.1002/jcb.1160.
- [40] Shelbayeh O, Arroum T, Morris S, Busch KB. PGC-1 $\alpha$  Is a Master Regulator of Mitochondrial Lifecycle and ROS Stress Response. *Antioxidants (Basel)*. 2023 May 10;12(5):1075. doi: 10.339
- [41] Bost F, Kaminski L. The metabolic modulator PGC-1 $\alpha$  in cancer. *Am J Cancer Res*. 2019 Feb 1;9(2):198-211. PMID: 30906622; 0/antiox12051075.
- [42] Zhang S, Liu X, Liu J, Guo H, Xu H, Zhang G. PGC-1  $\alpha$  interacts with microRNA-217 to functionally regulate breast cancer cell proliferation. *Biomed Pharmacother*. 2017 ;85:541-548. doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.062
- [43] Shiota M, Yokomizo A, Tada Y, Inokuchi J, Tatsugami K, Kuroiwa K, Uchiumi T, Fujimoto N, Seki N, Naito S. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$  interacts with the androgen receptor (AR) and promotes prostate cancer cell growth by activating the AR. *Mol Endocrinol*. 2010 ;24(1):114-27. doi: 10.1210/me.2009-0302.
- [44] Torrano V, Valcarcel-Jimenez L, Cortazar AR, Liu X, Urosevic J, Castillo-Martin M, Fernández-Ruiz S, Morciano G, Caro-Maldonado A, Guiu M, Zúñiga-García P, Graupera M,

Bellmunt A, Pandya P, Lorente M, Martín-Martín N, Sutherland JD, Sanchez-Mosquera P, Bozal-Basterra L, Zabala-Letona A, Arruabarrena-Aristorena A, Berenguer A, Embade N, Ugalde-Olano A, Lacasa-Viscasillas I, Loizaga-Iriarte A, Unda-Urzaiz M, Schultz N, Aransay AM, Sanz-Moreno V, Barrio R, Velasco G, Pinton P, Cordon-Cardo C, Locasale JW, Gomis RR, Carracedo A. The metabolic co-regulator PGC1 $\alpha$  suppresses prostate cancer metastasis. *Nat Cell Biol* 2016; 18(6):645-656. doi: 10.1038/ncb3357. Epub 2016 May 23. Erratum in: *Nat Cell Biol*. 2017 Jun 29;19(7):873.

[45] Dumont S, Le Pennec S, Donnart A, Teusan R, Steenman M, Chevalier C, Houlgatte R, Savagner F. Transcriptional orchestration of mitochondrial homeostasis in a cellular model of PGC-1-related coactivator-dependent thyroid tumor. *Oncotarget* 2018; 9(22):15883-15894. doi: 10.18632/oncotarget.24633.

[46] Cardol P, Figueroa F, Remacle C, Franzén L, González-Halphen D. Oxidative phosphorylation: building blocks and related components. *The Chlamydomonas Sourcebook*. 2009, chapter 13, pp. 469–502. doi: 10.1016/B978-0-12-370873-1.00021-6.

[47] Schöpf B, Weissensteiner H, Schäfer G, Fazzini F, Charoentong P, Naschberger A, Rupp B, Fendt L, Bukur V, Giese I, Sorn P, Sant'Anna-Silva AC, Iglesias-Gonzalez J, Sahin U, Kronenberg F, Gnaiger E, Klocker H. OXPHOS remodeling in high-grade prostate cancer involves mtDNA mutations and increased succinate oxidation. *Nat Commun* 2020; 11(1):1487. doi: 10.1038/s41467-020-15237-5.

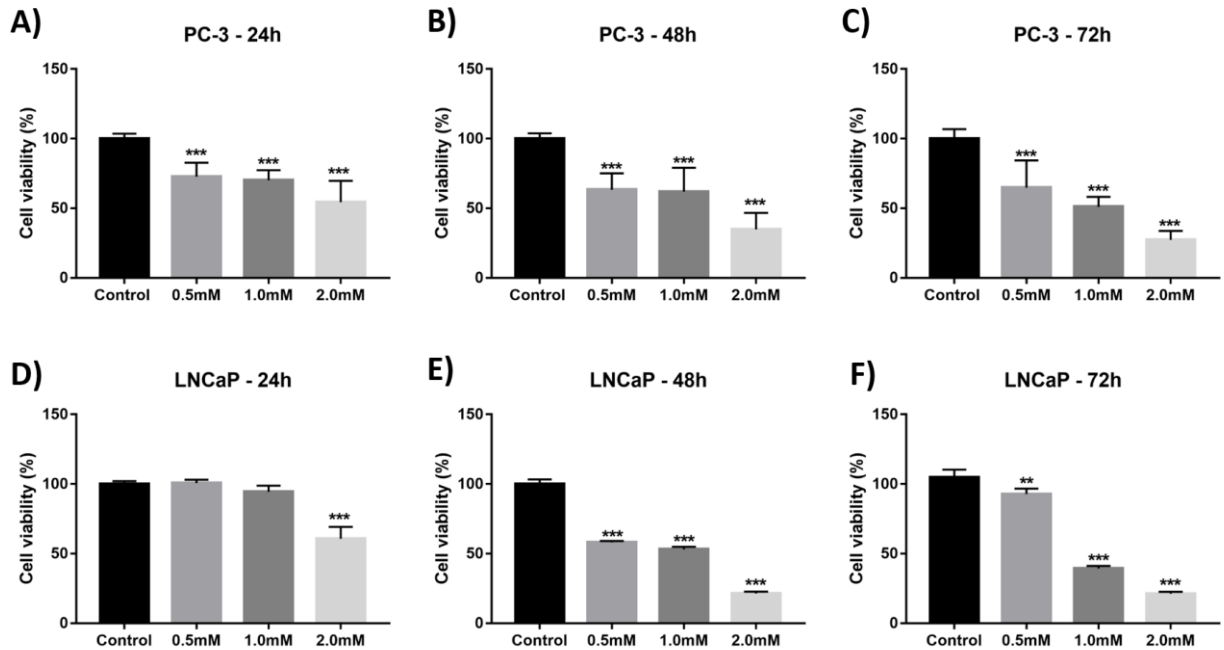
[48] Chen CL, Lin CY, Kung HJ. Targeting mitochondrial OXPHOS and their regulatory signals in prostate cancers. *Int J Mol Sci* 2021; 22(24):13435. doi: 10.3390/ijms222413435.

## FIGURES FILE – ARTIGO II

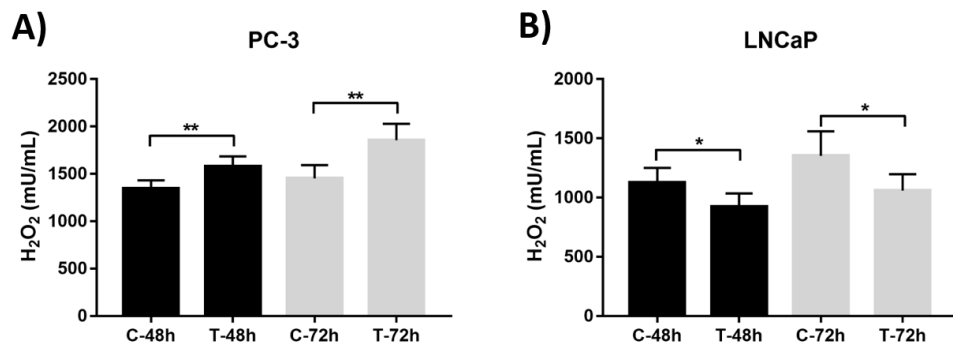
**Table 1. Antibodies for Western Blotting (WB)**

<b>Antibodie</b>	<b>Classification</b>	<b>Reference</b>	<b>Range dilution</b>
Anti-rabbit	Secondary	W4018, Promega Corporation	1:2000 - 1:6000
Anti-mouse	Secondary	W4021, Promega Corporation	1:2000 - 1:5000
Anti-goat	Secondary	14-13-06, KPL Antibodies & Conjugates	1:1000
$\beta$ -actina	Primary	ab8227 – Abcam	1:5000
4-HNE	Primary	AHP1251	1:3000 /1:50
Catalase	Primary	NBP2-24916	1:1000
OXPPOS	Primary	ab110413	1:1000
PGC-1 $\alpha$	Primary	ST1202	1:1000
SOD2	Primary	ab13533	1:500

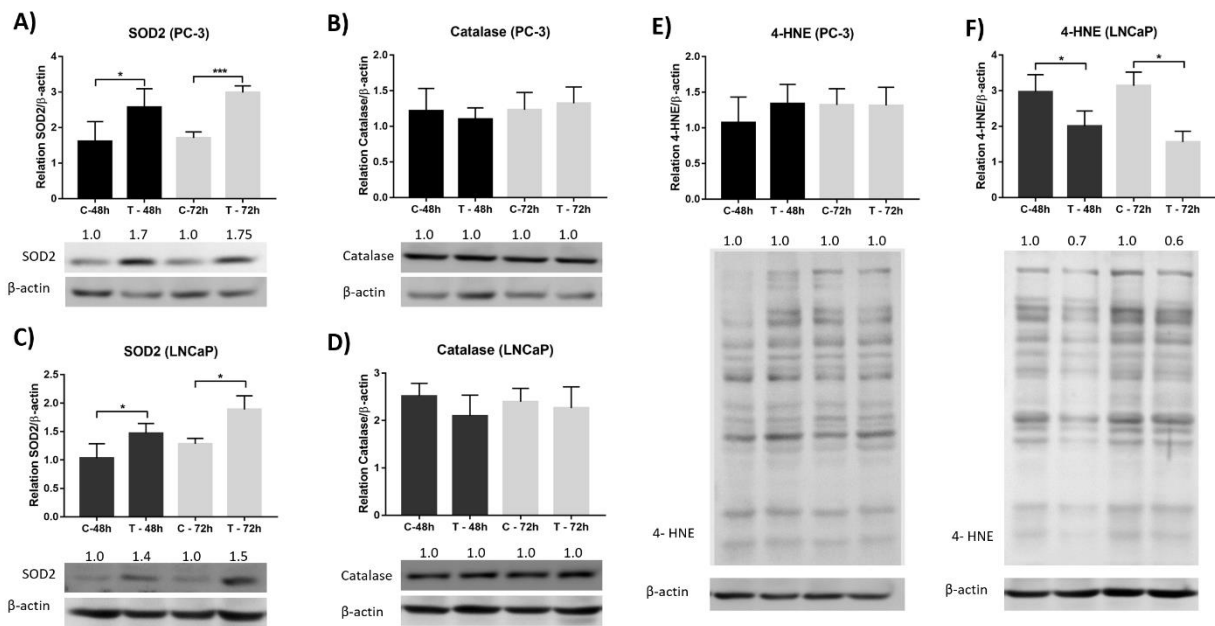
## FIGURES



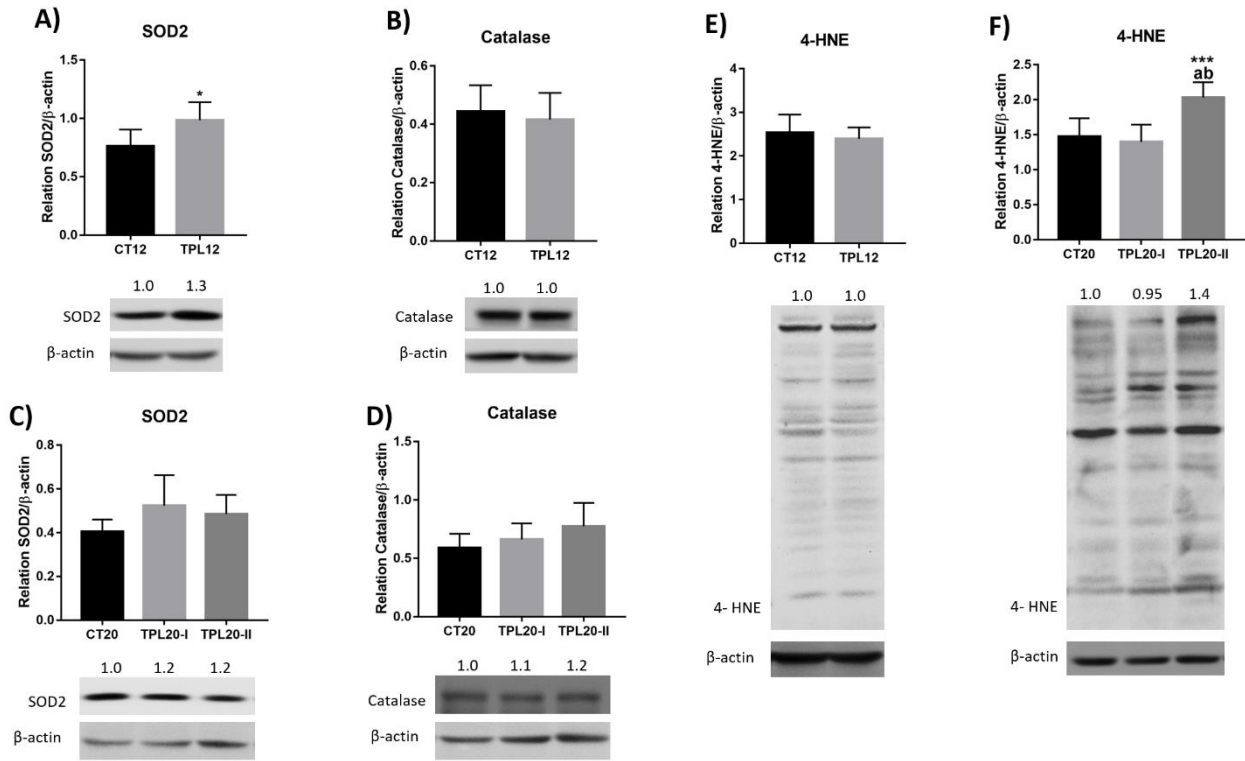
**Figure 1.** Trypan Blue cell viability test for both tumoral cell lines. Treatment doses occurred at concentrations of 0 (or Control), 0.5, 1.0, 2.0 mM of tempol in the culture medium, during 24, 48 and 72h of exposure. Statistical significance was given by comparison with the Control column (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).



**Figure 2.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> analyses content by Amplex Red ® for both cell lines. The treatment occurred at 1.0 mM for PC-3 and 2.0 mM for LNCaP, during 48 and 72h of exposure. Considering the same time point, statistical significance was evaluated between the control and treated group (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

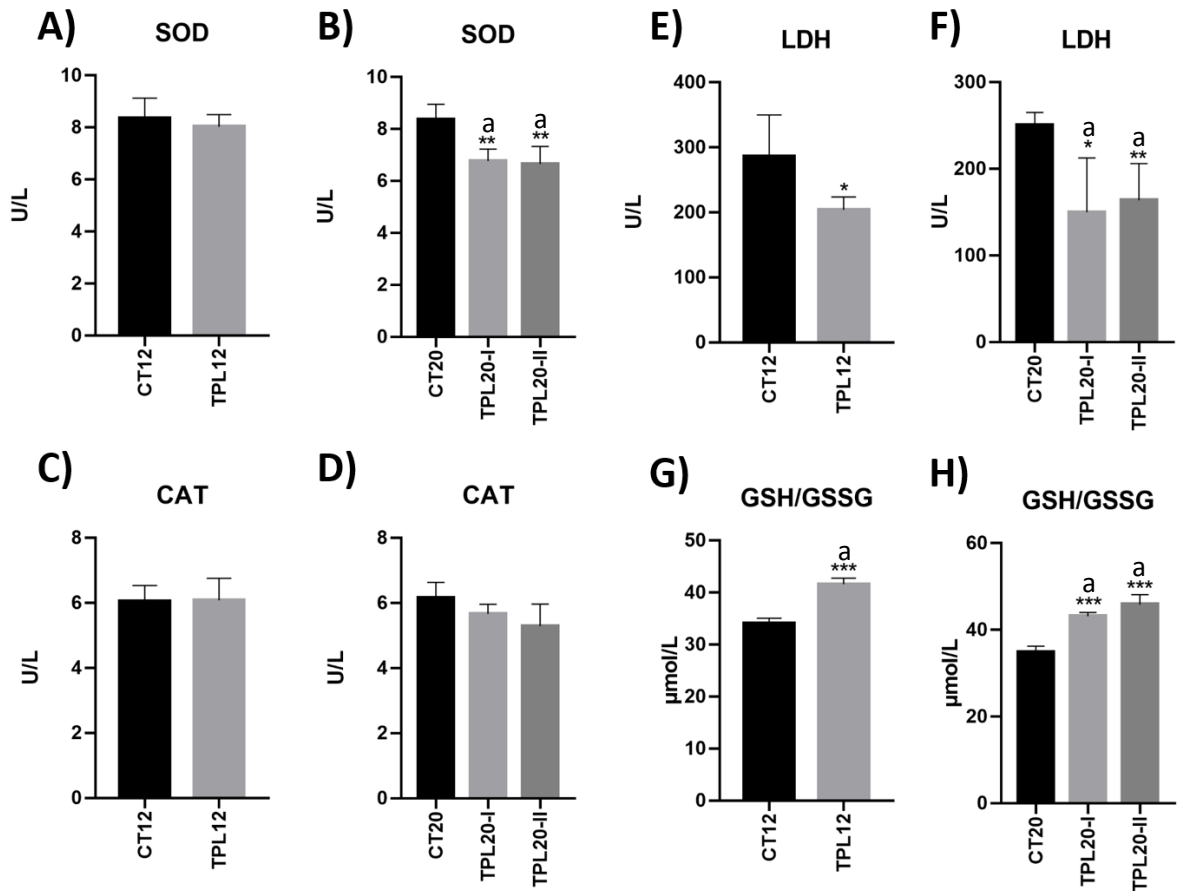


**Figure 3.** Graphics and representative bands of protein blots for both tumoral cell lines, PC-3 and LNCaP. Above the bands, the respective fold-change was given in relation to control. Considering the same time point, statistical significance was evaluated between the control and treated group (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

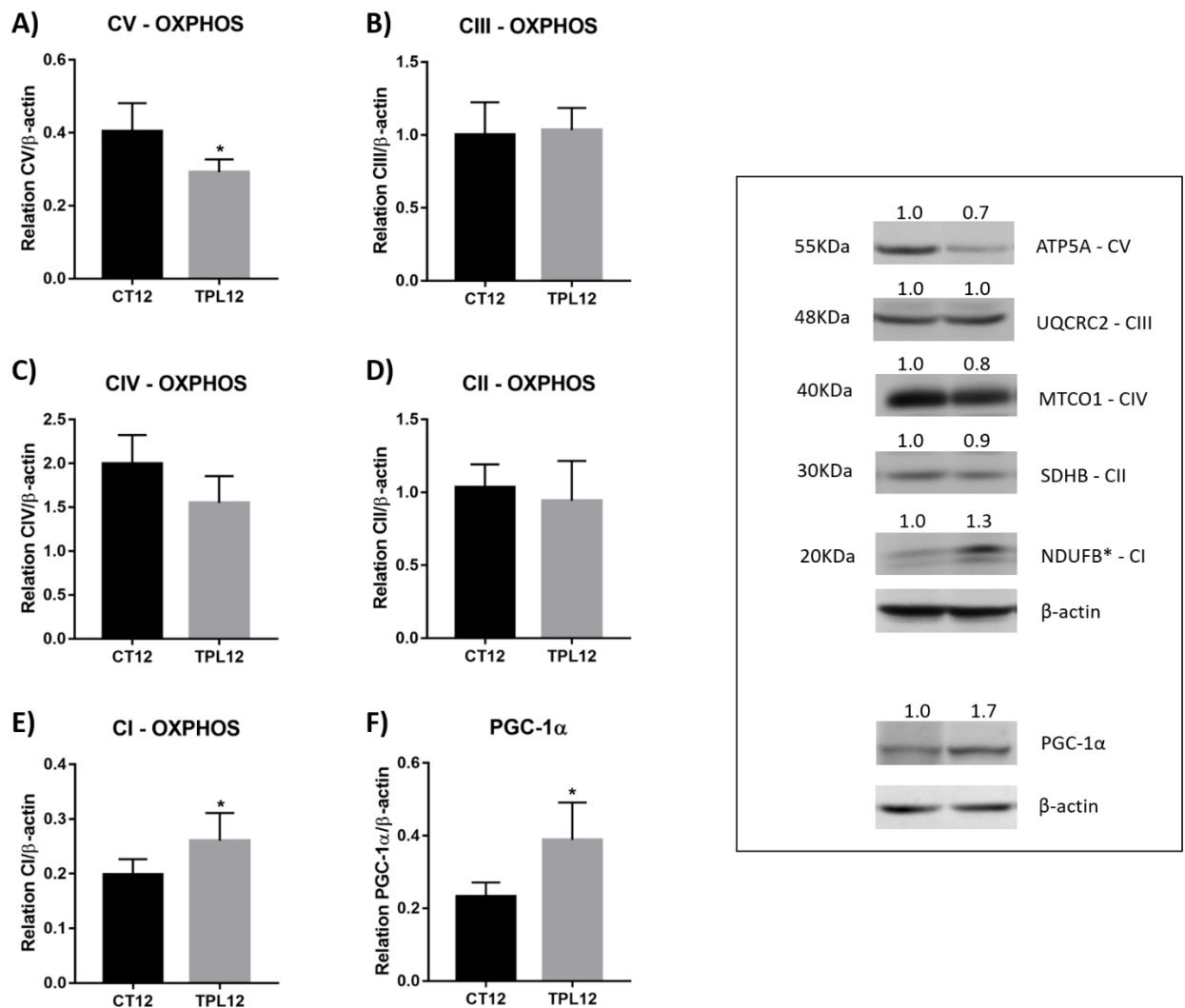


**Figure 4.** Graphics and representative bands of protein blots for early and late-stage of cancer progression in TRAMP model. Above the bands, the respective fold-change was given in relation to control. Considering the early-stage groups, statistical significance was evaluated between the control and treated group (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ). Considering the late-stage groups, letter “a” indicates statistical significance when compared to CT20 group; letter “b” indicates statistical significance when compared to TPL20-I group (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ).

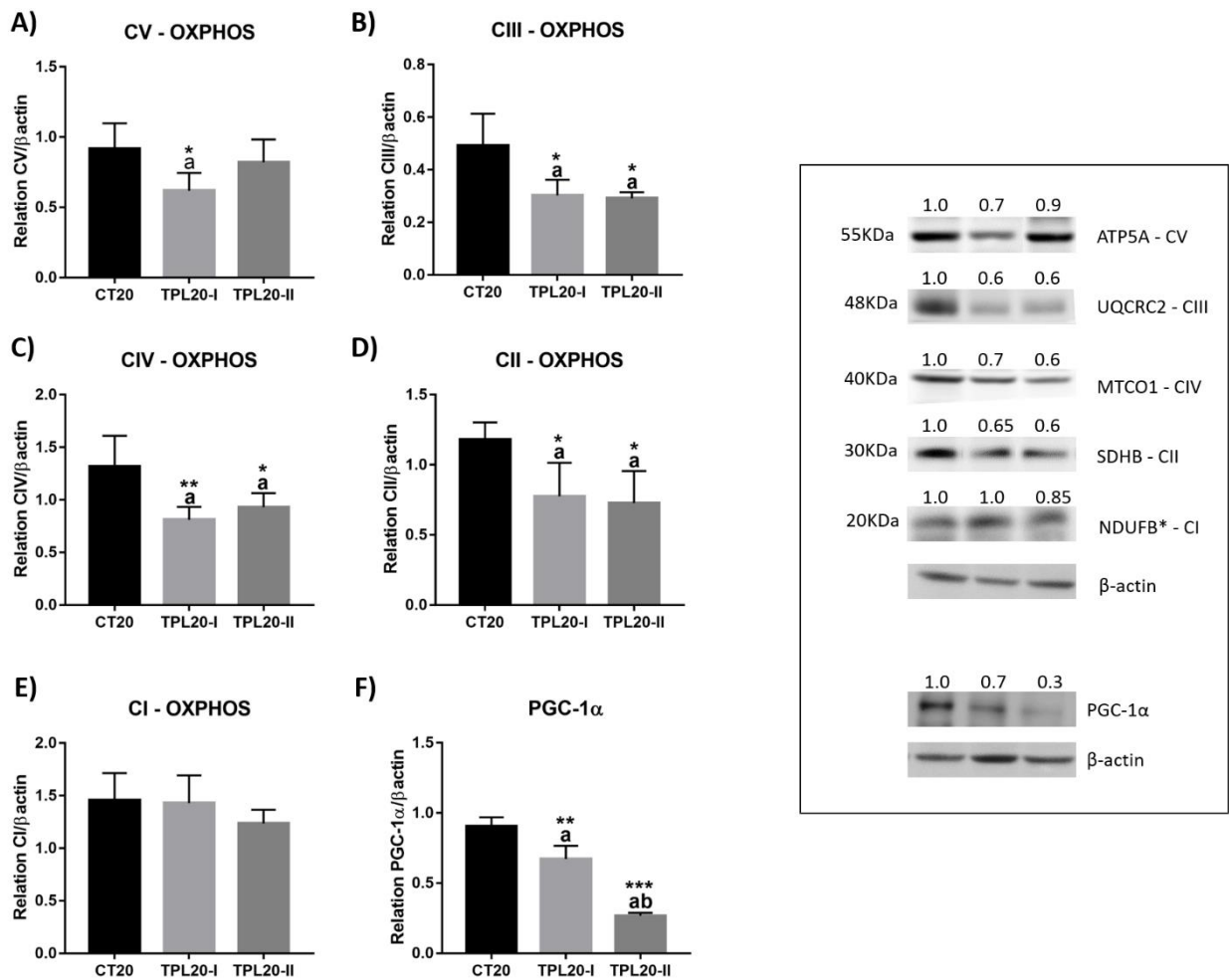




**Figure 5.** Graphics representing TRAMP model enzymatic activity in serum. Considering the early-stage groups, statistical significance was evaluated between the control and treated group (\* $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ). Considering the late-stage groups, letter “a” indicates statistical significance when compared to CT20 group; letter “b” indicates statistical significance when compared to TPL20-I group (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $< 0,0001$ ).



**Figure 6.** Graphics and representative bands of protein blots for early-stage of cancer progression in TRAMP model. Above the bands, the respective fold-change was given in relation to control. Considering the early-stage groups, statistical significance was evaluated between the control and treated group (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ).



**Figure 7.** Graphics and representative bands of protein blots for late-stage of cancer progression in TRAMP model. Above the bands, the respective fold-change was given in relation to control. Considering the late-stage groups, letter “a” indicates statistical significance when compared to CT20 group; letter “b” indicates statistical significance when compared to TPL20-I group (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ).

**C. ARTIGO CIENTÍFICO III:**

*MiRNAs e o potencial terapêutico do Tempol no câncer de próstata: uma abordagem pré-clínica (modelo TRAMP) e linhagens tumorais humanas*

*Artigo em fase de finalização para submissão a revista.*

Isabela, Rossetto<sup>a</sup>; Leonardo, Marson<sup>a</sup>; Letícia, Alves<sup>a</sup>; Felipe, Santos<sup>a</sup>; Murilo, Geraldo<sup>a</sup>,  
Valéria, Cagnon<sup>a</sup>

(a) Department of Structural and Functional Biology, State University of Campinas  
(UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Palavras-chave: câncer de próstata, miRNAs, NFκB, tempol, TRAMP, PC-3 e LNCaP.

## INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em homens em todo o mundo. Estima-se que, em 2020, mais de 1,4 milhão de novos casos tenham sido diagnosticados, culminando em aproximadamente 375 mil mortes relacionadas a essa doença<sup>1</sup>. Nos Estados Unidos e no Brasil, esta trata-se da malignidade não cutânea mais incidente e a segunda causa mais comum de morte entre os homens<sup>2</sup>. Assim, a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na progressão do câncer de próstata é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

A via do NFκB (Fator Nuclear Kappa B) é um importante caminho de sinalização celular, a qual tem sido amplamente investigada no microambiente do CaP<sup>3</sup>. O NFκB é um fator de transcrição que conta com diferentes componentes: NF-κB1 (também conhecida como p105), NF-κB2 (também conhecida como p100), RelA (também conhecida como p65), RelB e c-Rel<sup>3</sup>. Os membros transativantes (RelA, RelB e c-Rel) da família NFκB são mantidos inativos no citoplasma pela ligação dos inibidores de membros da família NFκB, os IκB's. Assim, os IκB's impedem o NF-κB de translocar para o núcleo e, então, participar da transcrição de importantes genes responsáveis por regular diversos processos biológicos, como a inflamação, apoptose, proliferação celular e resposta imunológica<sup>4</sup>.

Diversos estudos tem explorado estratégias terapêuticas que atuem em elementos da via do NFκB, a fim de atenuar a inflamação e a proliferação celular<sup>5, 6, 7</sup>. Recentemente, Rossetto et al.<sup>8</sup> demonstraram a capacidade do tempol, um nitróxido de grande valor biológico, de modular diferencialmente a inflamação em diferentes modelos pré-clínicos para o CaP, diminuindo os níveis proteicos de NFκB p65, TNF-α, e aumentando os níveis proteicos de IκB's.

O tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil), considerado um composto antioxidante e redox, tem demonstrado atividade anticancerígena em vários modelos experimentais<sup>9</sup>, no entanto, o seu papel de atuação especificamente no CaP ainda é pouco conhecido<sup>8, 10, 11</sup>. Ainda mais escassos são os estudos que relatam a ação do tempol na modulação da expressão gênica e na expressão de miRNAs<sup>12</sup>.

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificante que desempenham papel crucial na regulação pós-transcricional da expressão gênica<sup>13</sup>. Alterações na expressão de miRNAs têm sido observadas em diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de próstata, e estão associadas a processos como proliferação celular descontrolada, invasão, metástase e resistência à terapia<sup>14</sup>.

Para o estudo do CaP, vários modelos experimentais têm sido utilizados. Um desses modelos é o TRAMP (Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate), que envolve a expressão transgênica do oncogene do vírus da leucemia murina de células T (SV40 T/t) sob o controle do promotor específico da próstata<sup>15</sup>. Esse modelo tem similaridades biológicas a progressão tumoral observada no câncer de próstata humano e tem sido amplamente utilizado para estudar os mecanismos moleculares e as terapias direcionadas para essa doença<sup>16</sup>.

Além do modelo TRAMP, o uso de linhagens tumorais derivadas de pacientes com câncer de próstata também tem sido uma estratégia importante para o estudo dessa doença. Essas linhagens tumorais são mantidas em cultura e podem ser usadas para investigar os efeitos de diferentes abordagens terapêuticas, testar a eficácia de novos fármacos e avaliar a resposta individualizada dos pacientes<sup>17</sup>.

Isto posto, o presente estudo tem como objetivo verificar possíveis atuações do tempol no CaP, a níveis de expressão gênica e de miRNAs, explorando elementos da via do NFκB e miRNAs que apresentem interação com a via. Para tal, a ação diferencial do tempol no modelo TRAMP, no estágio inicial e avançado da progressão do CaP, foi observada bem como nas linhagens tumorais humanas PC-3 e LNCaP, se considerando características de independência e dependência androgênica dessas células.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Análises *in silico* para escolha dos miRs e genes alvos**

*Seleção de miRNAs para a validação experimental:* Para a seleção dos miRNAs analisados foram utilizadas duas estratégias: (i) busca na literatura para a seleção de miRNAs sabidamente envolvidos nos processos de inflamação e proliferação celular; (ii) identificação bioinformática de miRNAs que têm como alvos membros-chave da via do NFκB.

*Identificação bioinformática de miRNAs envolvidos na regulação da via desejada:* As listas de genes incluídos na categoria ontológica (GO Terms) “NFκB pathway” foram baixados da plataforma Kegg (kegg.jp). O programa miRWalk Versão 2.0 (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>) foi utilizado para a predição computacional de miRNAs para cada membro das categorias ontológicas de interesse. Os miRNAs que potencialmente regulam membros chave das categorias ontológicas de interesse foram selecionados para análise experimental *in vivo* e *in vitro*.

### **Cultura celular e reagentes**

Células tumorais das linhagens PC-3 (ATCC CRL-1435) e LNCaP (ATCC CRL-1740) foram cultivadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade em RPMI-1640 Medium (ATCC 30-2001), contendo L-glutamina com soro fetal bovino (SFB) a 10% (*Gibco, Life Technologies Inc., Grand Island, EUA*), 25 U/mL de penicilina/streptomicina (*Life Technologies Inc., Grand Island, EUA*). O meio de cultura foi substituído a cada 2 ou 3 dias e todos os experimentos foram realizados com células apresentando entre 60 e 80% de confluência.

### **Tratamento *in vitro* das linhagens celulares**

#### *Preparo das amostras*

As células PC-3 ( $3 \times 10^5$ ) e LNCaP ( $4 \times 10^5$ ) foram incubadas em placas de petri (60mm<sup>2</sup>) e tratadas ou não com tempol (*4-hidroxi-TEMPO, Sigma-Aldrich, REF 176141*) 24 horas após o procedimento do plaqueamento. A dose e o tempo de tratamento escolhidos para PC-3 e LNCaP foram baseados em estudo prévio de Rossetto et al. (2022). Ao final, obtiveram-se os seguintes grupos analisados:

- a. Grupo PC-3 Controle (PC-3-C):** culturas de células PC-3 mantidas em meio de cultura por 48 horas.
- b. Grupo PC-3 + tempol (PC-3-TPL):** culturas de células PC3 tratadas 48 com tempol adicionado ao meio de cultura na concentração de 1mM.
- c. Grupo LNCaP Controle (LNCaP-C):** culturas de células LNCaP mantidas em meio de cultura por 48 horas.
- d. Grupo LNCaP + tempol (LNCaP-TPL):** culturas de células LNCaP tratadas por 48 horas com tempol adicionado ao meio de cultura na concentração de 2mM.

### **Animais e procedimento experimental *in vivo***

O presente estudo utilizou-se de 50 camundongos transgênicos (*Mus musculus*), machos, da linhagem TRAMP (C57BL/6-Tg(TRAMP)8247Ng/J X FVB/NJ)F1/J), obtidos junto ao Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Esses camundongos TRAMP foram adquiridos por meio do projeto Fapesp 2010/51112-5, sendo a colônia estabelecida na UNICAMP. Durante o experimento, os animais tiveram acesso irrestrito a ração e água (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil), ficando alojados no Instituto de Biologia, no Biotério do Departamento de Biologia Celular e Estrutural (Área de Anatomia), até que atingissem a idade adequada para os tratamentos experimentais correspondentes.

Os camundongos da linhagem TRAMP foram divididos em diferentes conjuntos, consistindo em dois grupos destinados à avaliação da fase inicial da doença (CT12 e TPL12), e três grupos destinados à investigação das etapas mais avançadas das lesões, incluindo a análise de uma segunda dose de tratamento (CT20, TPL20-I, TPL20-II):

**Grupo CT12 (8 a 12 semanas):** 15 camundongos TRAMP com idade de 8 semanas. Receberam gavagem de água potável (veículo de diluição do tempol), ração padrão para camundongos e água ad libitum até a 12ª semana.

**Grupo TPL12 (8 a 12 semanas):** 15 camundongos TRAMP com idade de 8 semanas. Receberam gavagem de tempol (50 mg/Kg) diluído em água potável, cinco vezes por semana (uma dose diária), ração padrão para camundongos e água ad libitum até a 12ª semana.

**Grupo CT20 (16 a 20 semanas):** 15 camundongos TRAMP com idade de 16 semanas. Receberam gavagem de água potável (veículo de diluição do tempol), ração padrão para camundongos e água ad libitum até a 20ª semana.

**Grupo TPL20-I (16 a 20 semanas):** 15 camundongos TRAMP com idade de 16 semanas. Receberam gavagem de tempol (50 mg/Kg) diluído em água potável, cinco vezes por semana (uma dose diária), ração padrão para camundongos e água ad libitum até a 20ª semana.

**Grupo TPL20-II (16 a 20 semanas):** 15 camundongos TRAMP com idade de 16 semanas. Receberam tempol (100 mg/Kg) diluído em água potável, cinco vezes por semana (uma dose diária), ração padrão para camundongos e água ad libitum até a 20ª semana.

Os animais foram tratados com tempol (4-Hidroxi-TEMPO, 97%, Sigma-Aldrich - 176141) na dose de 50mg/Kg ou 100mg/Kg. Após as 4 semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados. O experimento foi realizado de acordo com o estabelecido para uso de animais experimentais pelo comitê de ética (CEUA:5115-1/2019,5115-1(A)-2020). Os lobos ventrais da próstata foram coletados e processados para as diferentes análises.

### **Análise experimental de mRNAs e miRNAs *in vivo* e *in vitro***

*Etapa de extração de RNA total:* O RNA total foi extraído tanto das linhagens celulares quanto das amostras teciduais de acordo com o protocolo descrito Chomczynski et al. (1987), utilizando-se reagente TRIzol (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

*Etapa de transcrição reversa para mRNAs:* Para a síntese do cDNA (DNA complementar) a transcrição reversa foi realizada utilizando-se os reagentes da Thermo Fischer (*Applied Biosystems*). A partir da concentração de RNA na amostra mensurada pelo nanofotômetro Implen P330, calculou-se o volume de amostra necessário para a obtenção de 2µg de RNA. Depois disso, para cada amostra foi acrescentado 1µL de Oligo(dt) (*Exxtend*,



*Brasil*), 1µL de dNTPmix 10mM (*Invitrogen, 18427013*) e o suficiente de H<sub>2</sub>O para a solução atingir 12µL. Essa solução foi incubada a 65°C por 5min, seguido de imediato resfriamento no gelo. Depois disso, foi acrescentado em cada tubo 2µL de 0.1 DTT, 4 µL de 5x first strand buffer, 1 µL de RNaseOUT 40 U/µL (*Invitrogen, 10777-019*) e 1µL de M-MLV Reverse Transcriptase 200U/µL (*Invitrogen, 280225-013*).

Os tubos contendo as amostras e os reagentes citados acima foram incubados em banho seco por 50 min a 42°C, com posterior inativação da reação a 70°C durante 15min.

*Etapa de transcrição reversa para miRNAs:* Para os miRNAs eleitos, a transcrição reversa foi realizada utilizando o kit *Taqman MiRNA Assays* específico para estes. Este kit utiliza-se da síntese dirigida de cDNA para os miRNAs em questão através do método Stem-Loop em que o primer específico para o miRNA promove a formação de um grampo sobre si mesmo, propiciando estabilidade para a transcrição reversa. A fim de otimizar a síntese de cDNA dos miRNAs, utilizou-se o kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*. Para isso, foram utilizados 10ng de RNA total para a síntese, acrescentando-se 1,5µL de tampão 10X, 0,15µL de mix de dNTP (100mM), 0,19µL de inibidor de RNases (20U/µL) e 1µL de transcriptase reversa *Multiscribe* (50U/µL), e 3µL de primer específico para os miRNAs eleitos.

Primeiramente, o mix foi preparado e mantido em gelo e depois submetido à variações de temperatura em termociclador *Cyclogene (Techne, Inglaterra)* a 16°C por 30 min, 42°C por 30min, seguida de inativação da transcriptase a 85°C por 5min.

*Etapa de PCR quantitativo em tempo real:* Foram utilizados 5µL do cDNA, 5µL do primer específico para o gene e 10µL de *SYBR Green PCR MasterMix (Thermo Fischer, REF 4309155)* para a quantificação do produto formado durante a reação de PCR para mRNA.

Para a detecção dos produtos formados durante a reação de PCR para os miRNAs, foram usados 1,33µL da síntese de cDNA, 10µL de *TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Thermo Fischer, REF 4440040) (AppliedBiosystems)*, 1µL do mix contendo sonda e primers específicos para os miRNAs escolhidos e 7,67µL de H<sub>2</sub>O destilada e deionizada (ddH<sub>2</sub>O).

As reações foram realizadas em termociclador *ABI 7300 Sequence Detection System® (Applied Biosystems)* nas seguintes condições: 50°C por 2min, 95°C por 10min, e 40 ciclos de 95°C por 15seg e 60°C por 1min. Após o término da reação, a especificidade da reação foi avaliada através da análise da dissociação do produto amplificado. O programa 7300 SDS Software foi utilizado para a análise dos dados obtidos.

*Cálculo da Expressão Gênica Diferencial:* Calculou-se a expressão relativa entre as amostras de acordo com o método descrito por Pfaffl, MW (2001), representadas abaixo. O

gene RPL19, que apresentou expressão estável em diferentes condições de tratamento no laboratório, foi escolhido como gene de referência para normalização das reações de qPCR para a análise de mRNA. O miRNA RNU6B (*Thermo Fischer, REF 4427975*) foi utilizado como gene de referência para as amostras de linhagens tumorais humanas. O miRNA U6 snRNA (*Thermo Fischer, REF 001973*).

$$R = \frac{Ef \text{ alvo}^{(Ct \text{ Controle} - Ct \text{ Tratada})}}{Ef \text{ endo}^{(Ct \text{ Controle} - Ct \text{ Tratada})}}$$

### Detecção dos miRNAs no plasma dos camundongos TRAMP

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA e, em seguida, submetidas a uma centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos. A fração de miRNAs foi isolada de todas as amostras através de um kit específico para extração de plasma, o kit miRNeasy Serum/Plasma (*QIAGEN, Hilden, Alemanha*), seguindo as instruções do fabricante. Para posterior normalização, utilizou-se um sistema de Spike-in (*Spike-in control, REF 219610*), adicionando-se uma quantidade conhecida do miR exógenos *cel-miR-39*, derivado do organismo *C. elegans*, a cada amostra.

O kit *TaqMan microRNA Reverse Transcription (Thermo-Fisher)* foi utilizado para obtenção do cDNA, seguindo as instruções do fabricante. Cerca de 10 ng de RNA extraído das amostras de plasma foram utilizados para a síntese. Nesse processo, adicionamos 1,5 µL de tampão 10X, 0,15 µL de um mix contendo desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) a uma concentração de 100 mM, 0,19 µL de inibidor de RNase (20 U/µL) e 1 µL de transcriptase reversa *Multiscribe* (50 U/µL), além de 3 µL de um primer específico para o miRNA de interesse e 4,16 µL de ddH<sub>2</sub>O. A reação teve início em ambiente refrigerado e, em seguida, foi submetida a uma temperatura de 16°C por 30 minutos, seguida por uma etapa a 42°C por 30 minutos. A inativação da transcriptase foi realizada a 85°C por 5 minutos utilizando um termociclador *Mastercycler Pro (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha)*.

O cDNA sintetizado foi então empregado na reação de qPCR, conduzida em um termociclador *ABI7500 (Thermo-Fisher)*. Para essa etapa, preparamos uma mistura reacional contendo 1,33 µL do cDNA sintetizado, 10 µL de *Taqman Universal Master Mix (Thermo-Fisher)*, 1,0 µL do ensaio *Taqman MiRNA Assay (Thermo-Fisher)* e 7,67 µL de ddH<sub>2</sub>O. As condições de ciclagem do qPCR incluíram uma etapa inicial a 50°C por 2 minutos, seguida de desnaturação a 95°C por 10 minutos e, posteriormente, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software 7500 SDS.

*Cálculo da Expressão Gênica Diferencial:* Calculou-se a expressão relativa entre as amostras de acordo com o método descrito por Pfaffl, MW (2001), representadas abaixo. O gene RPL19, que apresentou expressão estável em diferentes condições de tratamento no laboratório, foi escolhido como gene de referência para normalização das reações de qPCR para a análise de mRNA. O miRNA RNU6B (*Thermo Fischer, REF 4427975*) foi utilizado como gene de referência para as amostras de linhagens tumorais humanas. O miRNA U6 snRNA (*Thermo Fischer, REF 001973*).

$$R = \frac{E_f \text{ alvo}^{(Ct \text{ Controle} - Ct \text{ Tratada})}}{E_f \text{ endo}^{(Ct \text{ Controle} - Ct \text{ Tratada})}}$$

**Tabela 1.** Sequências dos primers dos genes humanos e de camundongos

Especificidade	Gene	Sequência 5'-3'
<i>Homo sapiens</i>	BCL2	ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC
	BCL2L1	GCCACTTACCTGAATGACCACC AACCAGCGGTTGAAGCGTTCCT
	PTGS2	TGGTGGAGAAGTGGGTTTTC CGGGAAGAAGTGCATTGAT
	RELA	ATTGCGGACATGGACTTCTC GAACACACCCACCAGAATC
	TNF	CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC
<i>Mus musculus</i>	BCL2	CCTGTGGATGACTGAGTACCTG AGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG
	BCL2L1	TTTCCCCTAAACCAGCTCCT CCACCAACAAGACAGGCTCT
	PTGS2	GAGTGGGGTGATGAGCAACT TGGTTGAAAAGGAGCTCTGG
	RELA	GTGCCTACCCGAAACTCAAC TGGGGGAAAACATCAAAG
	TNF	CTTGTTCCTCCTCTTTTGC TGGTCACCAAATCAGCGTTA

**Tabela 2.** Sequências dos miRs e referência Thermo-Fischer

Especificidade	miR	Referência	Sequência
<i>Homo sapiens</i>	hsa-miR-26a-5p	405	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
	hsa-miR-let-7c-5p	379	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
	RNU6B	1093	CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTTT
<i>Mus musculus</i>	mmu-miR-26a-5p	405	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
	mmu-miR-let-7c-5p	379	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
	mmu-155-5p	2571	UUAAUGC UAAUUGUGAUAGGGGU
	U6 snRNA	1973	GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGGAACGATACAGAGAAGA TTAGCATGGCCCCTGCGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCA TATTTT
<i>C. elegans</i>	cel-miR-39-3p	200	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG

## RESULTADOS

### Resultados da análise in silico para escolha de genes-alvo e miRNAs relacionados à via do NFκB

Para o norteamento das análises moleculares de mRNAs e miRNAs relacionados a inflamação, elegemos a via do NFκB como via escolhida para entender os efeitos da aplicação do tempol sobre o CaP. Para tanto, em primeiro lugar, os constituintes da via do NFκB foram baixados da KEGG PATHWAY Database (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – <https://www.genome.jp/kegg/>). A lista dos elementos dessa via foi inserida no software online miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) e todos os miRNAs a interagirem com os elementos da via do NFκB foram selecionados (baseando-se na escolha de 10 algoritmos de predição, tendo como condição a predição do algoritmo Targetscan ([https://www.targetscan.org/vert\\_80/](https://www.targetscan.org/vert_80/))).

A via do NFκB baixada da KEGG PATHWAY Database apresentou um total de 87 genes. Para esses genes-alvo, foram encontrados um total de 2578 miRNAs de interação predita com esses genes, contendo ao menos o algoritmo de predição do TargetScan. Optamos por selecionar os genes-alvo de maior interesse para o presente trabalho com base nas alterações de níveis proteicos que encontramos nos marcadores já mensurados dessa via. Assim, chegamos ao número de 5 genes de interesse, que serão mensurados na próstata dos camundongos TRAMP e nas linhagens celulares PC-3 e LNCaP.

Para esses 5 genes-alvo, pelo menos 1 dos 2578 miRNAs encontrados estabeleciam interação predita pelo TargetScan. Assim, para escolher os miRNAs que seriam analisados, optou-se por aqueles com maior número de interação por alvo. Ao final, chegamos à seguinte tabela:

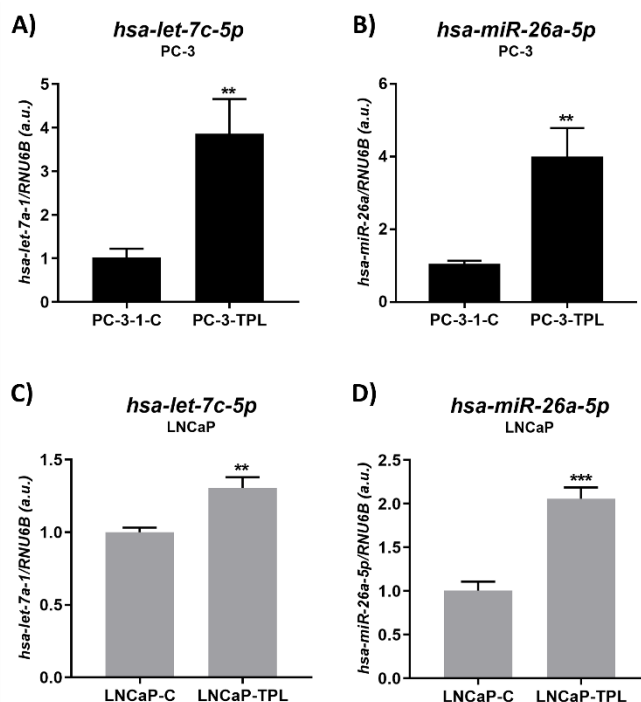
Para um refinamento da escolha dos miRNAs a serem mensurados, fizemos uma busca na literatura sobre a relação desses miR's listados na tabela com câncer de próstata. Alguns destes não são expressos em importância na próstata. Assim, selecionamos 3 miRNAs que consideramos interessantes explorar dentro do contexto estudado no presente trabalho: *miR-155-p*, *let-7c-5p* e *miR-26a-5p*.

**Tabela 1.** Interação entre genes-alvo e miRNAs. E número de algoritmos que predizem aquela interação.

miRNAs	Genes-alvo				
	BCL-2	BCL2L1	PTGS2	RELA	TNF
hsa-miR-448	10	2	2	1	1
hsa-let-7c-5p	4	9	5	2	3
hsa-miR-26a-5p	5	1	10	2	4
hsa-miR-124-3p	4	6	1	9	6
hsa-miR-181b-5p	9	1	9	1	7
hsa-miR-155-5p	7	1	5	7	1

## Tempol aumentou os níveis de expressão de miRNAs nas linhagens tumorais

A linhagem celular tumoral PC-3, andrógeno independente respondeu ao tratamento com tempol elevando a expressão do *miR-let7c-5p* (Figura 1A) e *miR-26a-5p* (Figura 1B). Da mesma forma, a linhagem LNCaP, andrógeno dependente, também elevou os níveis de expressão desses miRNAs após o tratamento (Figura 1C e 1D).

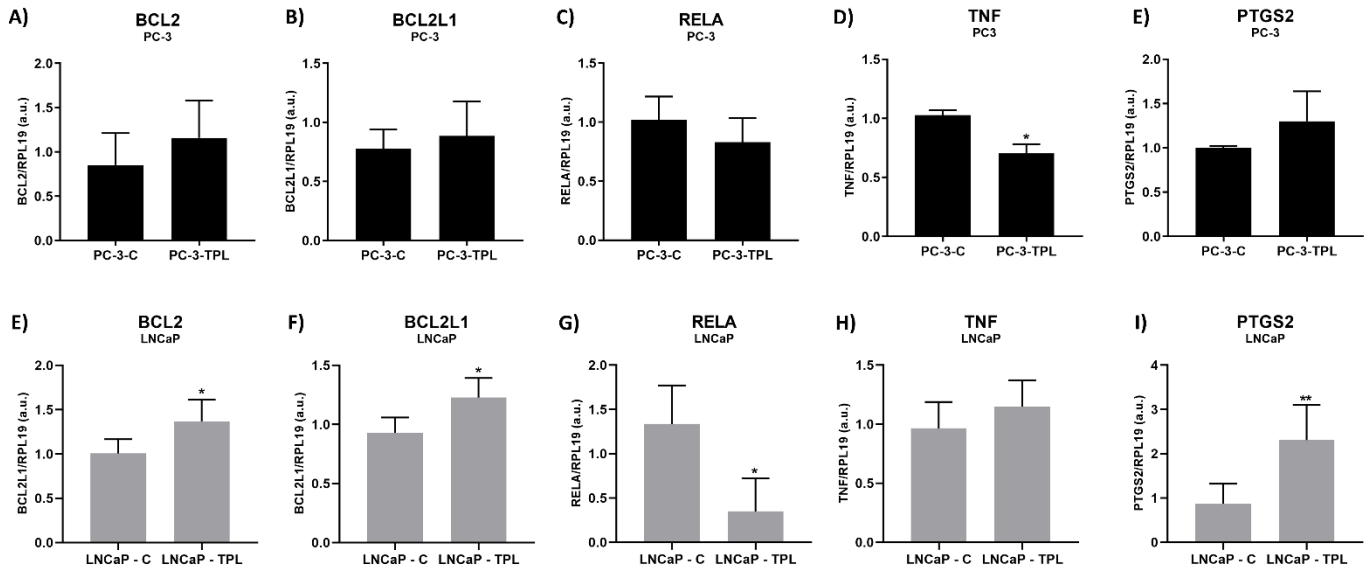


**Figura 1.** Níveis de expressão gênica para os microRNAs *hsa-let-7c-5p* e *hsa-miR-26a-5p* para as linhagens celulares PC-3 e LNCaP. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ).

## Tempol influenciou a expressão de genes alvos nas linhagens PC-3 e LNCaP

Para a linhagem PC-3, o tratamento com tempol foi capaz de diminuir significativamente a expressão gênica de TNF (Figura 2D). Para os outros genes analisados não ocorreram alterações estatisticamente expressivas.

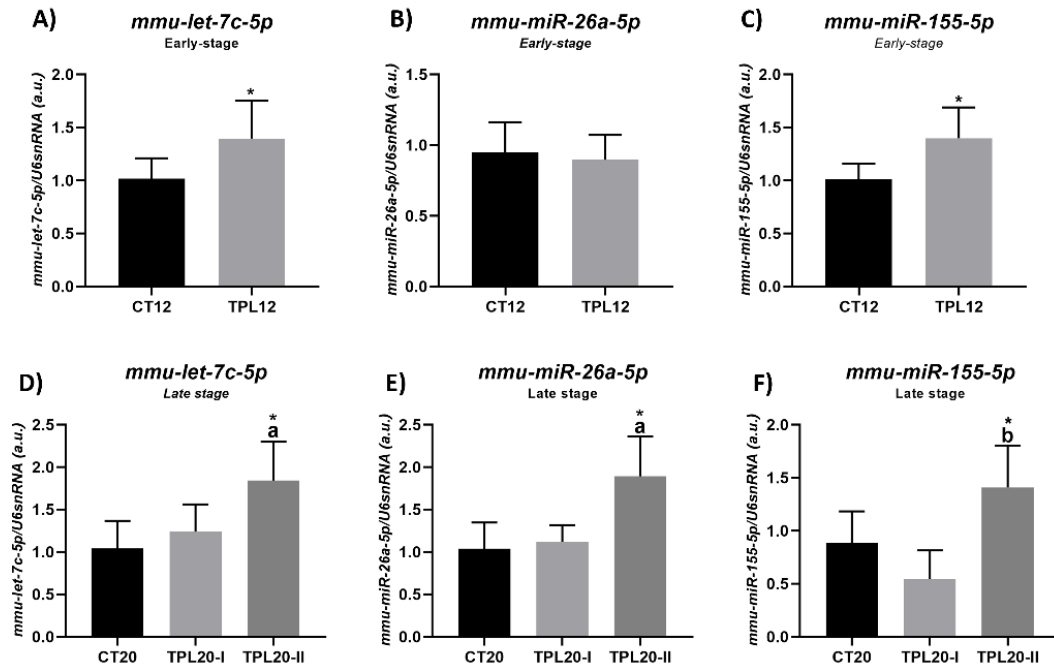
Para a linhagem LNCaP, o tratamento com tempol elevou os níveis da expressão gênica de BCL2 (Figura 2E), BCL2L1 (Figura 2F) e PTGS2 (Figura 2I). Além disso, diminuição da expressão gênica de RELA foi observada (Figura 2G) para essa mesma linhagem.



**Figura 2.** Níveis de expressão gênica para BCL2, BCL2L1, RELA, TNF e PTGS2 para as linhagens celulares PC-3 e LNCaP. (\*p<0,05, \*\*p<0,01).

### Tempo aumentou os níveis de expressão de miRNAs no tecido prostático

No modelo de camundongos TRAMP, assim como verificado nas linhagens celulares, o tempo elevou os níveis de expressão gênica após o tratamento. Particularmente, o tempo demonstrou efeito significativo sobre os *miRs let-7c-5p* (Figura 3<sup>a</sup>) e *mir-155-5p* (Figura 3C) no estágio inicial da progressão do CaP.

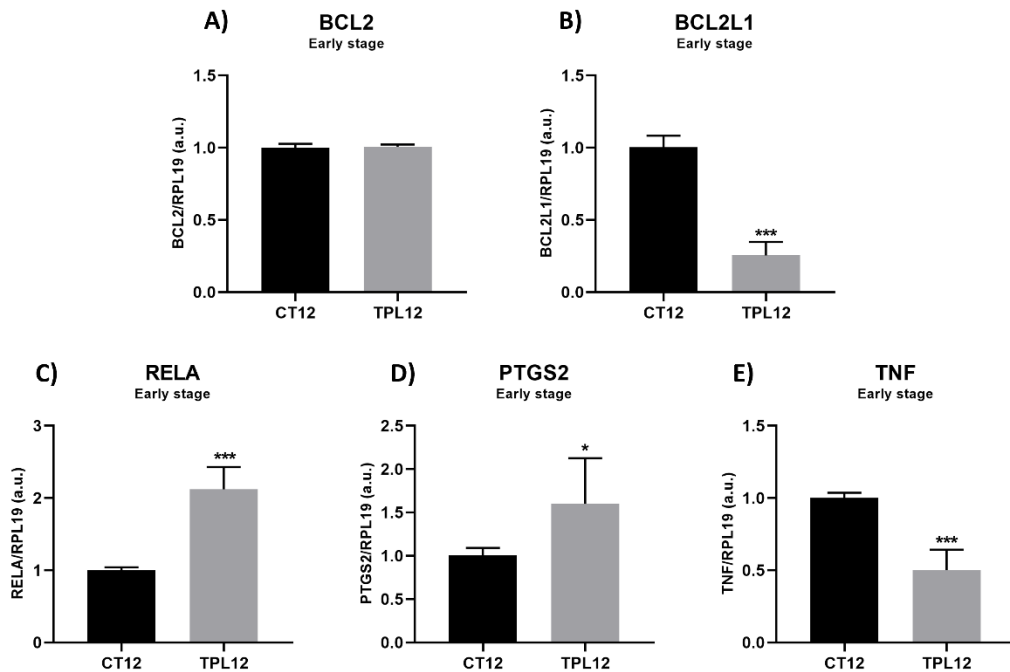


**Figura 3.** Níveis de expressão gênica *in vivo* para os microRNAs *mmu-let-7c-5p*, *mmu-miR-26a-5p* e *mmu-miR-155-5p*. A letra “a” denota diferença estatística em relação ao CT20. (\*p<0,05).

Para o estágio avançado, o tempol foi capaz de alterar os níveis de expressão dos *miRs let-7c-5p* (Figura 3D), *miR-26a-5p* (Figura 3E) e *miR-155-5p* (Figura 3F) apenas no grupo que recebeu a maior dose de tratamento (TPL20-II).

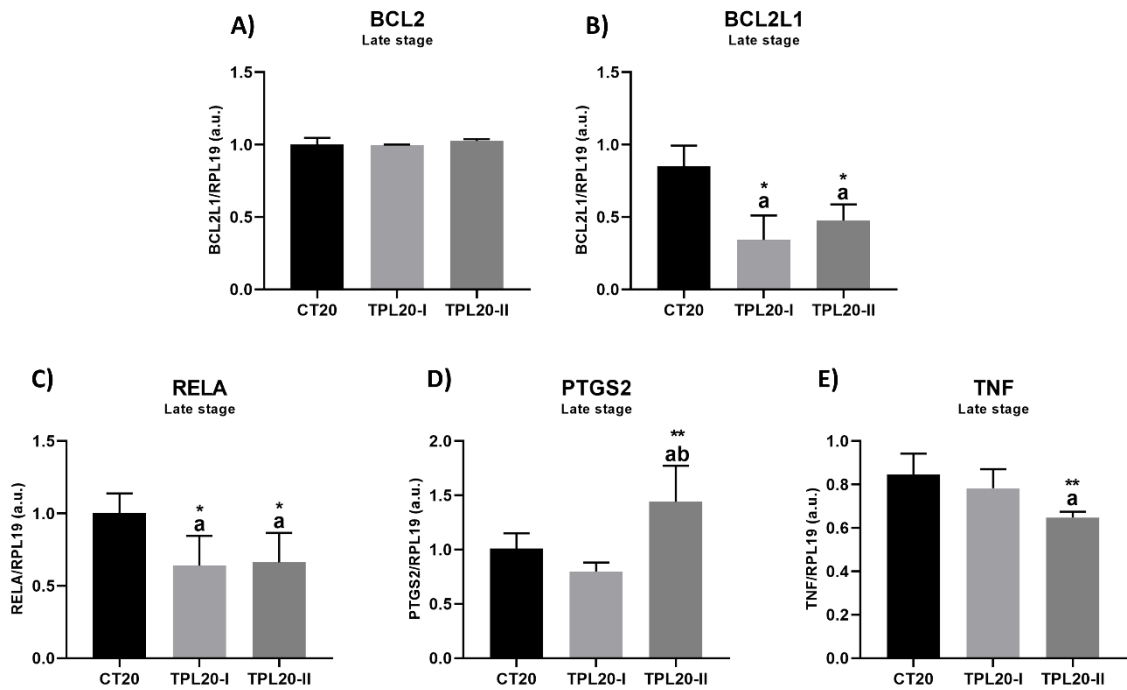
### Tempol influenciou a expressão de genes alvos no estágio inicial e avançado do CaP no modelo TRAMP

No estágio inicial, o tempol levou a diminuição da expressão gênica para de BCL2L1 (Figura 4B) e para TNF (Figura 4E). Também, levou ao aumento da expressão dos genes inflamatórios PTGS2 (Figura 4D) e RELA (Figura 4C).



**Figura 4.** Níveis de expressão gênica para BCL2, BCL2L1, RELA, PTGS2 e TNF para o estágio inicial do CaP no modelo TRAMP. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ )

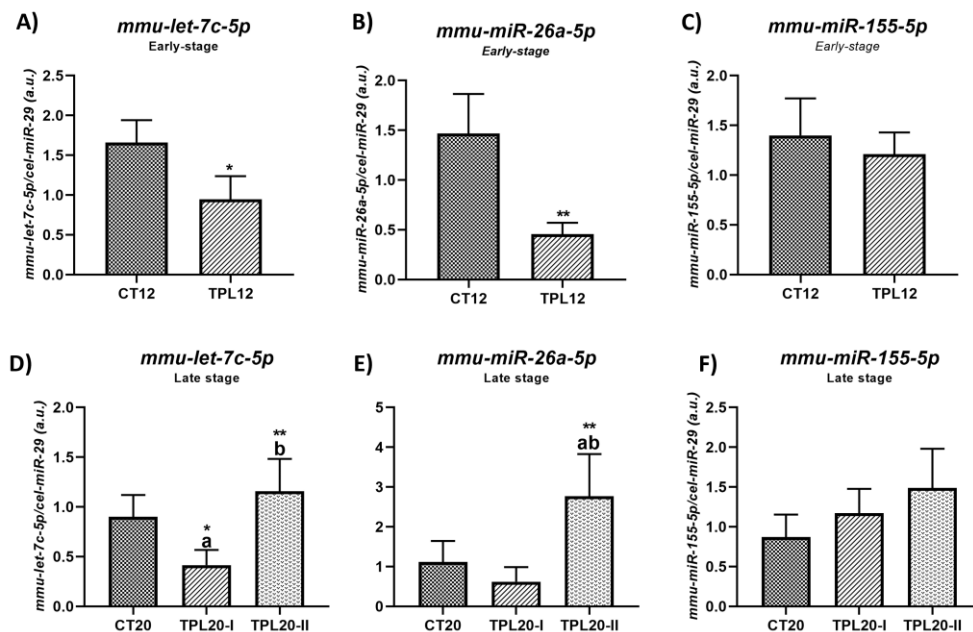
No estágio avançado, o tratamento com tempol levou a diminuição efetiva da expressão gênica de BCL2L1 (Figura 5B) e RELA (Figura 5C) para ambas as doses de tratamento estudadas. O grupo TPL20-II apresentou também alteração na expressão gênica de PTGS2 (Figura 5D) e diminuição da expressão de TNF (Figura 5E).



**Figura 5.** Níveis de expressão gênica para BCL2, BCL2L1, RELA, PTGS2 e TNF para o estágio avançado do CaP no modelo TRAMP. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ )

### MiRNAs circulantes sofreram influência do tempol no modelo TRAMP

Sistemicamente, o tratamento com tempol influenciou a expressão de miRNAs circulantes. No estágio inicial, diminuição expressiva dos miRs *let-7c-5p* (Figura 6<sup>a</sup>) e *miR-26a-5p* (Figura 6B) foi verificada.



**Figura 6.** Níveis da expressão sistêmica de miRNAs *in vivo* para os miRs *mmu-let-7c-5p*, *mmu-miR-26a-5p* e *mmu-miR-155-5p*. A letra “a” denota diferença estatística em relação ao CT20 e a letra “b” denota diferença estatística em relação a TPL20-I. (\* $p < 0,05$ ).

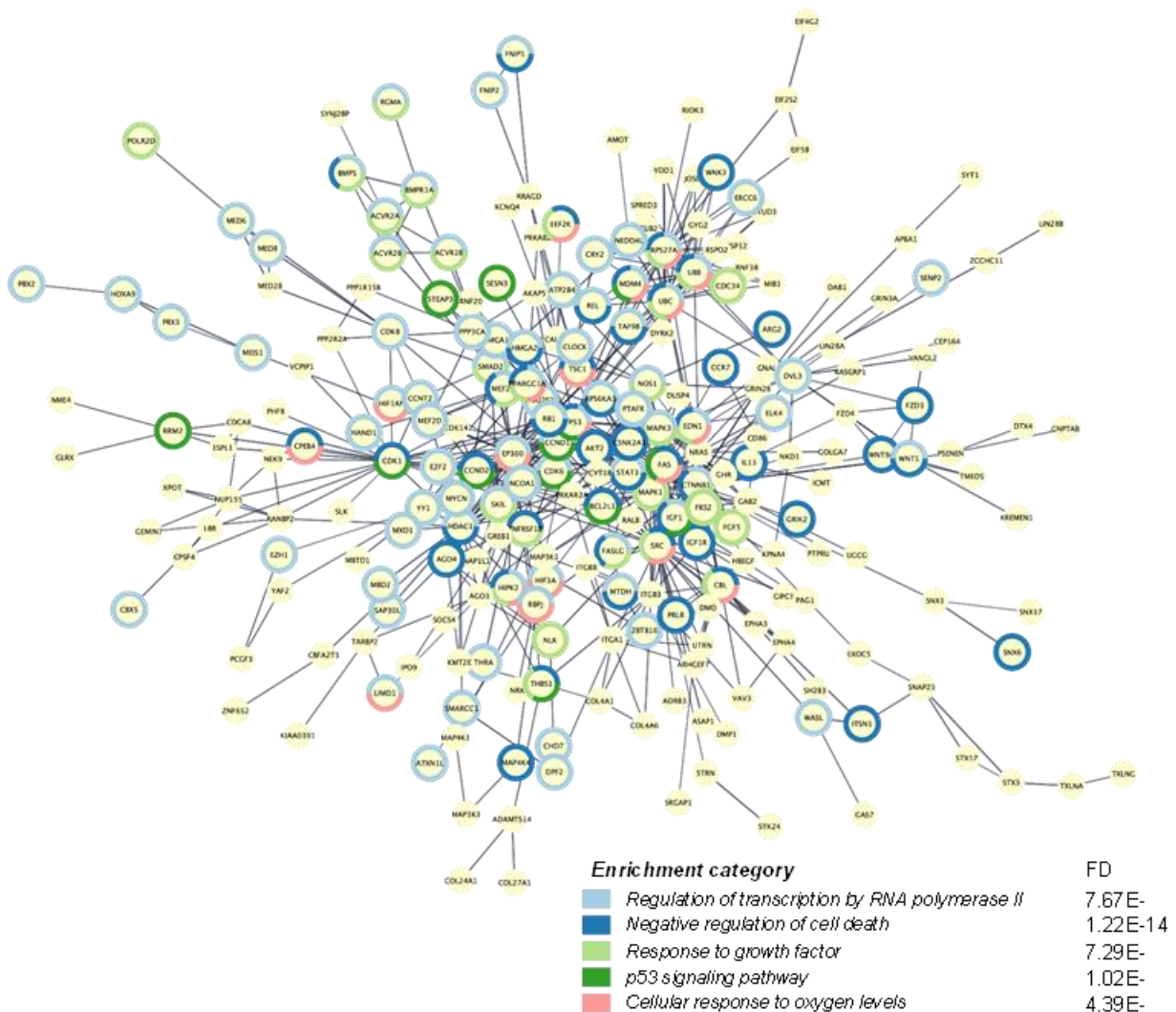


No estágio avançado do CaP, o tempol levou a diminuição do *miR-let-7c-5p* (Figura 6D) no grupo TPL20-I e aumento desse mesmo miRNA para o grupo TPL20-II. O *miR-26a-5p* aumentou no grupo tratado com o dobro da dose em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com a menor dose (Figura 6E)

O *miR-155-5p* não sofreu alteração após o tratamento em nenhum dos estágios analisados (Figura 6C e F).

### Categorias de enriquecimento gênico para o *miR-let-7c-5p*

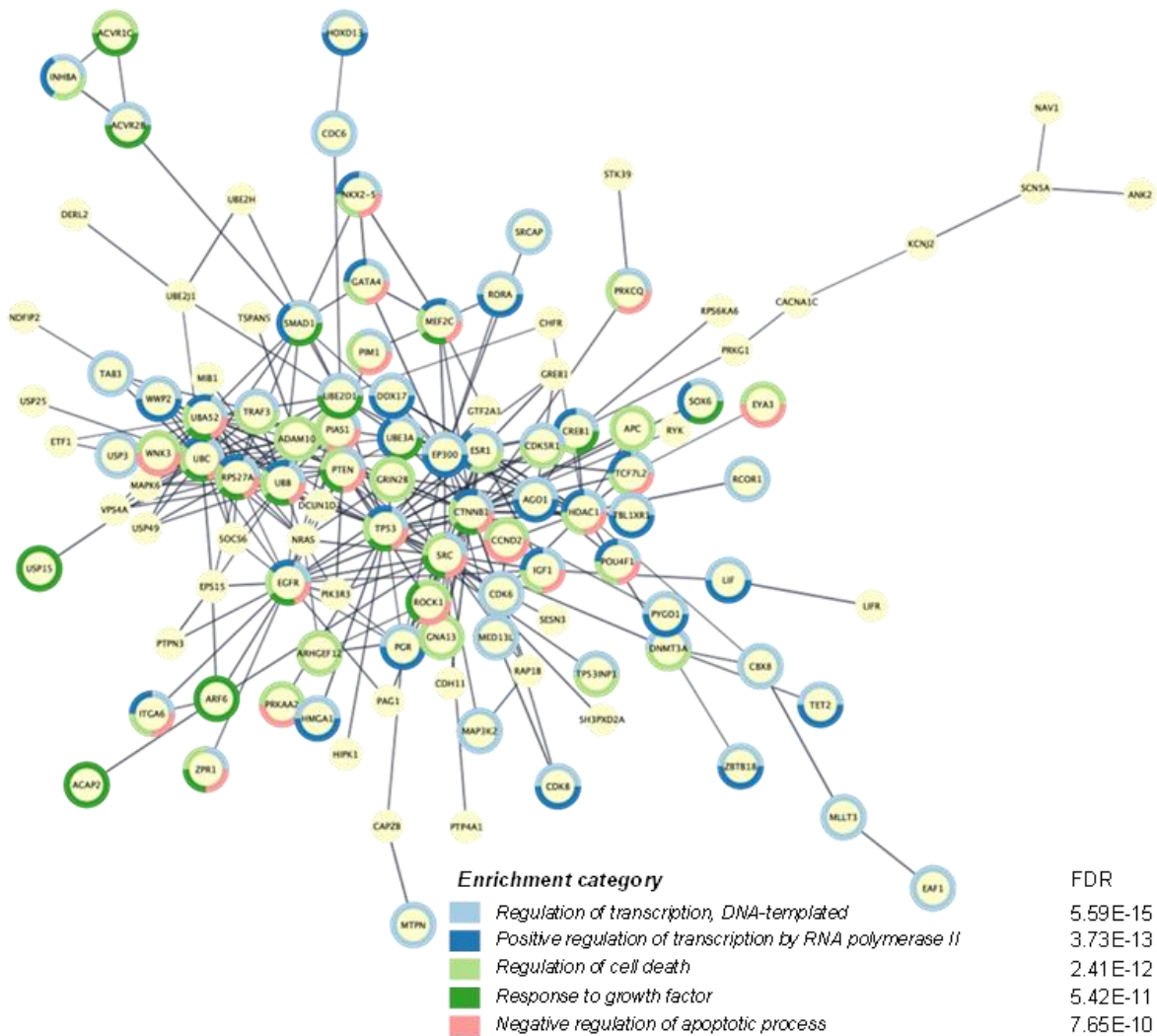
Após a análise bioinformática de enriquecimento gênico para o *miR-let-7c-5p*, as categorias de interação, possivelmente influenciadas pelo aumento desse miR, foram preditas após o tratamento com Tempol relacionadas a; (I) regulação da transcrição pela RNA polimerase II, (II) regulação negativa da morte celular, (III) regulação da resposta a fatores de crescimento, (IV) regulação da via de sinalização de p53, (V) regulação da resposta celular a níveis de oxigênio.



**Figure 1.** Network annotates protein-protein interactions predicted by STRING database of our list of *miR-let-7c-5p* predicted targets. Nodes represent proteins and edges the predicted interactions. Colored borders of nodes represent enrichment categories. Confidence score = 0.8. Additional interactions = 10.

### Categorias de enriquecimento gênico para o *miR-26a-5p*

Após a análise bioinformática de enriquecimento gênico para o *miR-26a-5p*, categorias de interação, possivelmente influenciadas pelo aumento desse miR, foram preditas após o tratamento com Tempol relacionadas a (I) regulação da transcrição por DNA – templated, (II) regulação da transcrição pela RNA polimerase II, (III) regulação da morte celular, (IV) regulação da resposta a fatores de crescimento, (V) regulação negativa do processo apoptótico.

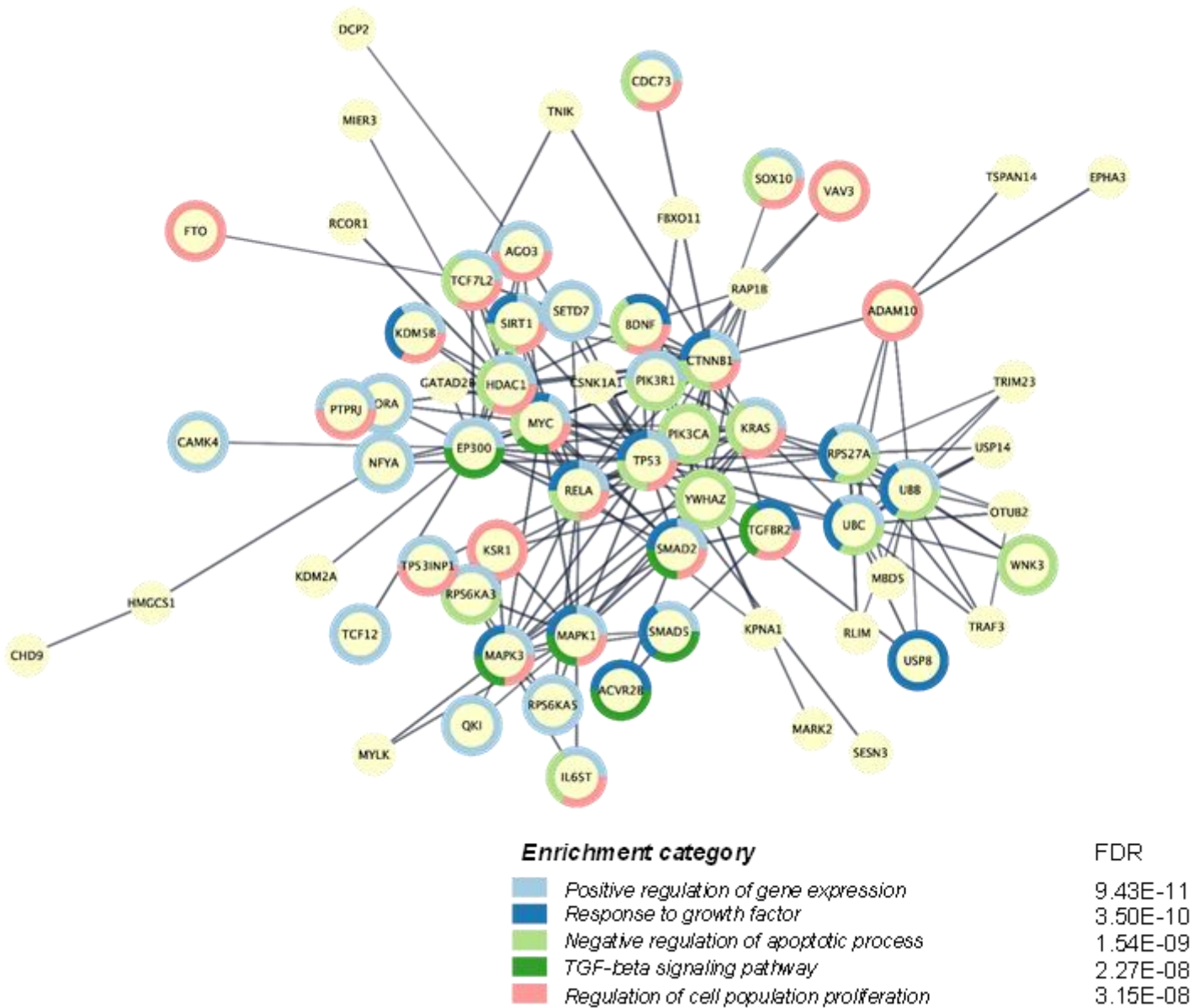


**Figure 2.** Network annotates protein-protein interactions predicted by STRING database of our list of *miR-26a-5p* predicted targets. Nodes represent proteins and edges the predicted interactions. Colored borders of nodes represent enrichment categories. Confidence score = 0.8. Additional interactions = 10.

### Categorias de enriquecimento gênico para o *miR-155-5p*

Após a análise bioinformática de enriquecimento gênico para o *miR-155-5p*, categorias de interação, possivelmente influenciadas pelo aumento desse miR, foram preditas após o tratamento com Tempol relacionadas a (I) regulação positiva da expressão gênica, (II)

regulação da resposta a fatores de crescimento, (III) regulação negativa do processo apoptótico, (V) regulação da sinalização pelo TGF-beta, (V) regulação da proliferação de populações celulares.



**Figure 3.** Network annotates protein-protein interactions predicted by STRING database of our list of miR-155-5p predicted targets. Nodes represent proteins and edges the predicted interactions. Colored borders of nodes represent enrichment categories. Confidence score = 0.8. Additional interactions = 10.

## DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez na literatura o tratamento com tempol alterando os níveis de expressão de genes e miRNAs em diferentes modelos experimentais para o CaP. Uma importante tendência do tempol em aumentar a expressão dos miRNAs escolhidos foi observada, tanto tecidual quanto sistemicamente, para quase todas as condições experimentais analisadas. Além disso, apesar do uniforme aumento de miRNAs, foi possível observar a resposta diferencial e diversa da expressão de genes pertencentes à via do NFκB após o tratamento, que variou de acordo com o tipo de linhagem tumoral ou o estágio de progressão do CaP estudado.

Os miRNAs *let-7c-5p*, *26<sup>a</sup>-5p* e *155-5p*, analisados no presente estudo, interagem com diferentes elementos da via do NFκB. Os presentes resultados auxiliam na compreensão de outros resultados prévios já obtidos e se relacionam com os níveis proteicos reduzidos de marcadores inflamatórios, de proliferação tecidual e sobrevivência celular encontrados e publicados por Rossetto et al. (2023). De maneira complementar ao que já se conhece, pode-se entender os possíveis mecanismos de ação do tempol dentro da maquinaria celular, sugerindo, principalmente, a sua atuação no silenciamento gênico através do controle pós-transcricional promovido por esses miRNAs sobre os elementos da via do NFκB.

O silenciamento gênico mediado por miRNA é uma parte importante da regulação da expressão gênica em muitos tipos de doenças<sup>18</sup>. No contexto do câncer, alguns miRNAs podem-se encontrar completamente desregulados, em particular aqueles que controlam genes supressores de tumor e oncogenes<sup>19</sup>. Mais especificamente no CaP, vários miRNAs alterados foram identificados, sendo associados ao desenvolvimento e progressão do câncer de próstata. Por exemplo, a expressão do oncogene *miR-429* é baixa em células normais, mas muito aumentada em células de câncer de próstata<sup>20</sup>. Outro exemplo trata-se do *miR-940*, que é o regulador direto da proteína MIEN1 (Mirance and Invasion Enhancer 1). A regulação negativa desse miRNA leva ao aumento da expressão de MIEN1 que promove invasão e metástase de células de câncer de próstata<sup>21</sup>.

Estudando-se especificamente o *miR-let-7c-5p*, Nadiminty et al.<sup>22</sup> demonstraram que esse miRNA encontra-se diminuído no CaP e a sua presença na célula suprime o crescimento desse câncer. Apesar de baixa, esse mesmo estudo mostrou que a expressão de *miR-let-7c-5p* ocorre a níveis um pouco mais altos para LNCaP quando comparada às células PC-3 ou DU145, refratárias a hormônios<sup>22</sup>. Mulholland et al.<sup>23</sup> realizaram três buscas bioinformáticas para a identificação de miRNAs supostamente implicados na patogênese do CaP e concluíram que

apenas *miR-let-7c-5p* era comum a todos os três bancos de dados pesquisados, salientando que a sua baixa expressão tem reconhecido papel na patogênese do CaP. Esse estudo conclui que é necessária a pesquisa de terapias que atuem de modo a reestabelecer os níveis normais de miRNAs no tecido<sup>23</sup>. Salientando a importância de reestabelecer os níveis teciduais do *miR-let-7c-5p*, Kurniawati et al.<sup>24</sup> sugeriram que exossomos derivados de células mesenquimais podem servir como um sistema terapêutico de entrega de *let-7c* para atingir o câncer de próstata resistente a castração, suplementando de forma exógena os níveis desse miR. Analisando os resultados do presente trabalho e correlacionando com o que já se encontra na literatura para o *miR-let-7c-5p*, pode-se inferir que os modelos experimentais estudados aqui apresentavam níveis diminuídos desse miR e que o tratamento com tempol, aumentando a expressão de *let-7c*, foi capaz de reestabelecer seus níveis de expressão gênica.

O *miR-let-7c-5p*, como demonstrado pelas análises *in silico*, atua principalmente na regulação de BCL2L1, dentre os genes escolhidos para a análise no presente trabalho. A proteína codificada por este gene, a BCL-XL/S pertence à família de proteínas BCL-2 e está localizada na membrana mitocondrial externa, sendo responsável por regular a abertura do canal da membrana mitocondrial externa (VDAC)<sup>25</sup>. O VDAC regula o potencial de membrana mitocondrial e, portanto, controla a produção de espécies reativas de oxigênio e a liberação de citocromo C pelas mitocôndrias, ambas potentes indutoras de apoptose celular. A isoforma mais longa dessa proteína atua como um inibidor apoptótico. Assim, o aumento do *miR-let-7c-5p* tende a, canonicamente, inibir a transcrição de BCL-XL/S, impedindo a inibição da apoptose gerada pela sua presença na célula<sup>25</sup>. Para as linhagens tumorais PC-3 e LNCaP, mais evidentemente para LNCaP, os níveis de expressão gênica de BCL2L1 aumentaram após o tratamento com tempol. Considerando-se que nessas células houve aumento da repressão na transcrição desse gene, podemos supor uma resposta celular compensatória para tentar manter, como antes, os níveis desse marcador. Isso é possível no tratamento *in vitro* pois o tempo de exposição ao tempol pode ser considerado curto para efeitos de desestabilização e degradação do mRNA<sup>26</sup>. O mesmo, no entanto, não pode ser dito quanto ao comportamento de BCL2L1 nos animais, em que o período de tratamento experimental foi o suficiente para reduzir significativamente os níveis de mRNA em ambos os estágios e doses de tratamento.

Com relação aos efeitos do tempol sobre o *miR-26a-5p*, observou-se que o tratamento alterou os níveis de expressão desse miR nas linhagens celulares e particularmente no estágio avançado de progressão do CaP, no grupo TPL20-II. Esse miR também tem reconhecido papel antiproliferativo no câncer<sup>27, 28, 29</sup>. É reconhecido como um miRNA supressor de tumor, frequentemente subregulado em tecidos tumorais, bem como em linhagens de células

tumorais<sup>30</sup>. No CaP, Guo et al.<sup>31</sup> demonstraram que a perda do *miR-26a-5p* promoveu proliferação, migração e invasão através da regulação negativa de SERBP1. Por outro lado, a reexpressão de *miR-26a-5p* na linhagem celular de tumoral PC-3, independente de androgênio, resgatou a atividade desse supressor tumoral, reprimindo diretamente WNT5A e inibindo a proliferação celular<sup>32</sup>. Em linhas gerais, pode-se dizer que o tempol foi capaz de reestabelecer os níveis do *miR-26a-5p*, assim como o observado para o *miR-let-7c-5p*. Rizzo e colaboradores<sup>33</sup> demonstraram os benefícios do reestabelecimento dos níveis de expressão do *miR-26a-5p* para as células tumorais DU145 de CaP.

Dentre os genes analisados pelo presente trabalho, o *miR-26a-5p* apresenta forte interação predita para PTGS2. Esse gene codifica a enzima chave na biossíntese de prostaglandinas envolvidas na inflamação e na mitogênese, também conhecida como ciclooxigenase-2 (COX-2)<sup>34</sup>. Assim, o aumento do *miR-26a-5p* implica na supressão de COX-2 no tecido. Rossetto et al.<sup>8</sup> reportaram o tempol diminuindo os níveis de imunolocalização tecidual de COX-2 para o estágio inicial da progressão do CaP no modelo TRAMP. Apesar disso, os níveis de expressão gênica do *miR-26a-5p* não aumentaram após o tratamento nesse estágio. No presente trabalho, aumento da expressão gênica de PTGS2 foi observado após o tratamento com tempol, tanto nas linhagens celulares, quanto no modelo *in vivo*.

Apesar da baixa interação predita com o gene RELA, Zhang et al.<sup>35</sup> observaram essa possível interação entre esse mRNA e o *miR-26a-5p* na linhagem PC-3. Por interagir principalmente com genes relacionados à inflamação, o *miR-26a-5p* apresenta também importante caráter anti-inflamatório<sup>36,37</sup>. Chen, Zhou e Wu<sup>36</sup> demonstraram que o bloqueio do *miR-26a-5p* promoveu inflamação renal, induzida de maneira dependente de NF- $\kappa$ B nas células tubulares renais de camundongos.

O *miR-155-5p* tem participação na inflamação tecidual e, em geral, a sua atuação nesse processo depende da localização imune da sua expressão<sup>18</sup>. Apesar de ser um dos miRNAs mais bem caracterizado da literatura, alguns estudos verificaram seu comportamento como um agente pró-inflamatório<sup>38</sup> e outros como um agente anti-inflamatório<sup>39</sup> a depender da interação com outros elementos celulares ou diferentes vias. Particularmente no CaP, Yao et al.<sup>41</sup> demonstraram que o *miR-155-5p* diminuiu a invasão e a migração celular pela modulação do alvo SOCK1. Santo et al.<sup>41</sup> identificaram miRNAs-chave na progressão do câncer de próstata com base na construção da rede miRNA-mRNA e encontraram que o *miR-155-5p* foi estágio-específico, estando aumentado apenas nas amostras de CaP Gleason 6.

O *miR-155-5p* é usualmente tido como um miRNA dependente de NF $\kappa$ B<sup>42</sup>. Yang et al.<sup>43</sup> especularam que a expressão aumentada de *miR-155* pode restringir a via de sinalização de



NFκB a fim de reduzir efetivamente a apoptose induzida por IL-1β, inflamação e estresse oxidativo em células do núcleo pulposo de ratos. No presente trabalho, o tratamento com tempol aumentou os níveis de expressão gênica do *miR-155-5p* no estágio inicial e para o grupo TPL20-II, no estágio avançado do CaP. Concomitantemente ao aumento desse miR houve aumento da expressão do gene RELA no estágio inicial da progressão do CaP nos camundongos TRAMP, e diminuição da expressão de RELA após ambos os tratamentos no estágio avançado.

Apesar do aumento de *miR-155-5p* e o congruente aumento de expressão de RELA observados no estágio inicial no presente trabalho, Rossetto et al.<sup>8</sup> demonstraram anteriormente importante diminuição dos níveis de NFκB p65 tanto para o estágio inicial quanto avançado do CaP no modelo TRAMP após tratamento com tempol. Juntamente com os níveis proteicos de NFκB p65 outros importantes marcadores inflamatórios foram averiguados no tecido prostático, e parâmetros morfológicos confirmaram a diminuição do processo inflamatório após o tratamento. Assim, o presente trabalho levanta uma hipótese de que, apesar do aumento do *miR-155-5p* trazido pelo tempol, ele não levou ao aumento do processo inflamatório para o tecido. Assim, sugere-se que a regulação da inflamação, observada após o tratamento com tempol, talvez não dependa da sinalização *miR-155/NFκB*, sugerindo que outros miRNAs, de papel anti-inflamatório preponderante possam estar atuando no tecido prostático.

Ainda sobre a expressão gênica tecidual, é importante observar que o tempol apresentou efeito inibidor importante sobre o gene TNF. Este gene codifica uma citocina pró-inflamatória multifuncional que pertence à superfamília do fator de necrose tumoral (TNF). Essa citocina é secretada principalmente por macrófagos e pode se ligar e, portanto, funcionar por meio de seus receptores TNFRSF1A/TNFR1 e TNFRSF1B/TNFR<sup>44</sup>. Ainda, trata-se de um mediador inflamatório solúvel que pode influenciar toda a dinâmica do microambiente tumoral<sup>45</sup> e é um dos maiores supra reguladores da expressão de NFκB<sup>46</sup>. No presente trabalho, o tempol diminuiu a expressão gênica de TNF para as células PC-3, para o estágio inicial e para o grupo TPL20-II no estágio avançado do CaP. Juntamente com o reportado por Rossetto et al.<sup>8</sup>, que demonstrou que o tempol diminuiu significativamente os níveis proteicos de TNF-α para PC-3, LNCaP e também para os grupos tratados no modelo TRAMP, entende-se que a atenuação da expressão dessa citocina seja um dos pontos de regulação da inflamação mais importantes decorrentes do tratamento com tempol. Assim, sugere-se fortemente que tempol levou a uma diminuição ou atraso no início da cascata inflamatória. A própria produção de TNF-α é amplificada pela ativação do NFκB, levando a uma intensificação do processo inflamatório, devido à maior produção de citocinas inflamatórias, em um feedback positivo<sup>47</sup>. Assim, a redução dos níveis de TNF em grande parte dos procedimentos experimentais aqui estudados

ênfatiza o potencial do tempol como terapia elegível para CaP, devido aos efeitos supressores da inflamação nas diversas especificidades dessa doença.

Por fim, o tempol alterou significativamente alguns miRNAs circulantes no plasma dos camundongos TRAMP. Uma vez presentes na corrente sanguínea, os miRNAs possuem ações sistêmicas, sendo direcionados para os mais diversos órgãos e tecidos. Em termos gerais, para os miRNAs *let-7c-5p* e *26<sup>a</sup>-5p*, pode-se dizer que, no plasma, a dose de 50mg/kg de tempol trouxe diminuição dos níveis circulantes desses miRs em ambos os estágios de progressão; e a dose de 100mg/kg trouxe aumento desses miRs para o estágio avançado. Sendo assim, infere-se que o dobro da dose induziu aumento dos miRs circulantes. O *miR-155-5p* não sofreu alterações após o tratamento.

Em pacientes com CaP, Cochetti et al.<sup>48</sup> estudaram diferentes níveis de microRNAs séricos no câncer de próstata e na hiperplasia prostática benigna, avaliando pequenos marcadores com potencial diagnóstico e papel prognóstico. Encontraram que os níveis circulantes de *let-7c-5p* e *miR-26a-5p* diminuíram significativamente a expressão em pacientes com CaP em comparação com pacientes com BPH. Essa é uma divergência interessante em relação ao presente trabalho, que se utilizou de camundongos para o estudo. Apesar da diminuição circulante desses mesmos miRs, o tempol não trouxe aumento da agressividade das lesões prostáticas no modelo TRAMP.

## CONCLUSÃO

Após a análise das diversas condições experimentais para o CaP, conclui-se que o tempol supra regulou a expressão de miRNAs relacionados à via do NFκB no tecido prostático e nas linhagens tumorais humanas. Apesar de sua ação uniforme em relação ao comportamento dos miRs, os mRNAs sofreram alterações diferenciais de acordo com a dependência hormonal ou o estágio das lesões estudadas.

O dobro da dose de tempol foi mais eficaz na ação tecidual de modulação dos miRNAs. Os miRNAs sistêmicos também sofreram alteração com o tratamento e os seus de expressão no plasma não necessariamente corresponderam ao observado no tecido prostático. Assim, conclui-se que a resposta molecular ao tempol, a nível de expressão gênica, foi dose-dependente.

Em geral, os miRNAs regulados estão principalmente ligados à sobrevivência celular e seu aumento está ligado ao aumento da morte celular e ao atraso da agressividade do CaP. Assim, insere-se na mecânica tecidual do tempol a sua capacidade de silenciamento gênico



mediado por miRNA para a diminuição dos processos de proliferação tecidual e sobrevivência celular.

Ao aumentar os níveis do *miR-155-5p*, sugere-se que esse miR parece não mediar a resposta celular inflamatória ao tempol. O principal ponto de atuação do tempol como anti-inflamatório foi diminuir a expressão gênica de TNF e assim suprimir a iniciação da cascata inflamatória de ativação do NF $\kappa$ B.

O presente trabalho de caráter exploratório da ação do tempol sobre a expressão gênica no CaP reforça seus efeito anti-inflamatório e antiproliferativo. Assim, o seu uso pode ser recomendado como terapia para o CaP. No entanto, mais uma vez se destaca a necessidade de uma consideração individualizada das características do câncer para a sua aplicação, levando-se em conta a dose a ser utilizada, o estágio de progressão da lesão e a sua resposta a hormônios.

#### **AGRADECIMENTOS**

Esta pesquisa recebeu financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processos: 2018/21647-6; 2021/02108-0) e parcialmente do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (bolsa: 140699/2019-8).

#### **CONFLITO DE INTERESSE**

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* 2023; 73(1):17-48. doi: 10.3322/caac.21763.
- [2] INCA. Câncer de Próstata. Available in: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>>. Access: june, 4th, 2023.
- [3] Staal J, Beyaert R. Inflammation and NF- $\kappa$ B Signaling in Prostate Cancer: Mechanisms and Clinical Implications. *Cells*. 2018 Aug 29;7(9):122. doi: 10.3390/cells7090122. PMID: 30158439; PMCID: PMC6162478.
- [4] Zinatizadeh MR, Schock B, Chalbatani GM, Zarandi PK, Jalali SA, Miri SR. The Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling in cancer development and immune diseases. *Genes Dis*. 2020 Jul 18;8(3):287-297. doi: 10.1016/j.gendis.2020.06.005. PMID: 33997176; PMCID: PMC8093649.
- [5] Kido LA, Rossetto IMU, Baseggio AM, Chiarotto GB, Alves LF, Santos FR, Lamas CA, Jr MRM, Cagnon VHA. Brazilian Berry Extract Differentially Induces Inflammatory and Immune Responses in Androgen Dependent and Independent Prostate Cancer Cells. *J Cancer Prev*. 2022 Sep 30;27(3):182-191. doi: 10.15430/JCP.2022.27.3.182. PMID: 36258714; PMCID: PMC9537582.
- [6] Montico F, Lamas CA, Rossetto IMU, Baseggio AM, Cagnon VHA. Lobe-specific responses of TRAMP mice dorsolateral prostate following celecoxib and nintedanib therapy. *J Mol Histol*. 2023 Jun 19. doi: 10.1007/s10735-023-10130-z. Epub ahead of print. PMID: 37335420.
- [7] Stark T, Livas L, Kyprianou N. Inflammation in prostate cancer progression and therapeutic targeting. *Transl Androl Urol*. 2015 Aug;4(4):455-63. doi: 10.3978/j.issn.2223-4683.2015.04.12. PMID: 26816843; PMCID: PMC4708587.
- [8] Rossetto I, Santos F, Kido L, Lamas C, Montico F, Cagnon V. Tempol differential effect on prostate cancer inflammation: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Prostate*. 2023 Apr;83(5):403-415. doi: 10.1002/pros.24473. Epub 2022 Dec 22. PMID: 36546327.
- [9] Wilcox CS. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol Ther*. 2010 May;126(2):119-45. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.01.003. Epub 2010 Feb 11. PMID: 20153367; PMCID: PMC2854323.
- [10] Lejeune D, Hasanuzzaman M, Pitcock A, Francis J, Sehgal I. The superoxide scavenger TEMPOL induces urokinase receptor (uPAR) expression in human prostate cancer cells. *Mol Cancer*. 2006 Jun 6;5:21. doi: 10.1186/1476-4598-5-21. PMID: 16756681; PMCID: PMC1533855.

- [11] Thomas R, Sharifi N. SOD mimetics: a novel class of androgen receptor inhibitors that suppresses castration-resistant growth of prostate cancer. *Mol Cancer Ther.* 2012 Jan;11(1):87-97. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0540. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22172488; PMCID: PMC3256291.
- [12] Li T, Zhang T, Gao H, Wang H, Yan H, Wan Z, Liu R, Yin C. Tempol modulates lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA networks in ovaries of DHEA induced PCOS rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2023 Feb;226:106175. doi: 10.1016/j.jsbmb.2022.106175. Epub 2022 Oct 29. PMID: 36374793.
- [13] Shi Y, Liu Z, Lin Q, Luo Q, Cen Y, Li J, Fang X, Gong C. MiRNAs and Cancer: Key Link in Diagnosis and Therapy. *Genes (Basel).* 2021 Aug 23;12(8):1289. doi: 10.3390/genes12081289. PMID: 34440464; PMCID: PMC8395027.
- [14] Urabe F, Yamamoto Y, Kimura T. miRNAs in prostate cancer: Intercellular and extracellular communications. *Int J Urol.* 2022 Dec;29(12):1429-1438. doi: 10.1111/iju.15043. Epub 2022 Sep 19. PMID: 36122303.
- [15] Greenberg NM, DeMayo F, Finegold MJ, Medina D, Tilley WD, Aspinall JO, Cunha GR, Donjacour AA, Matusik RJ, Rosen JM. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Apr 11;92(8):3439-43. doi: 10.1073/pnas.92.8.3439. PMID: 7724580; PMCID: PMC42182.
- [16] Kido LA, de Almeida Lamas C, Maróstica MR Jr, Cagnon VHA. Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP) model: A good alternative to study PCa progression and chemoprevention approaches. *Life Sci.* 2019 Jan 15;217:141-147. doi: 10.1016/j.lfs.2018.12.002. Epub 2018 Dec 4. PMID: 30528182.
- [17] Namekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells. *Cells.* 2019 Jan 20;8(1):74. doi: 10.3390/cells8010074. PMID: 30669516; PMCID: PMC6357050.
- [18] Hu J, Huang S, Liu X, Zhang Y, Wei S, Hu X. *miR-155*: An Important Role in Inflammation Response. *J Immunol Res.* 2022 Apr 6;2022:7437281. doi: 10.1155/2022/7437281.
- [19] Khan S, Ayub H, Khan T, Wahid F. MicroRNA biogenesis, gene silencing mechanisms and role in breast, ovarian and prostate cancer. *Biochimie.* 2019 Dec;167:12-24. doi: 10.1016/j.biochi.2019.09.001. Epub 2019 Sep 4. PMID: 31493469.
- [20] Ouyang, Y., Gao, P., Zhu, B., Chen, X., Lin, F., Wang, X. ... Zhang, H. (2015). Downregulation of microRNA-429 inhibits cell proliferation by targeting p27Kip1 in human

prostate cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 11, 1435-1441. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2782>

[21] S. Rajendiran, A.V. Parwani, R.J. Hare, et al. MicroRNA-940 suppresses prostate cancer migration and invasion by regulating MIEN1. *Mol. Cancer*, 13 (2014), p. 250

[22] Nadiminty N, Tummala R, Lou W, Zhu Y, Shi XB, Zou JX, Chen H, Zhang J, Chen X, Luo J, deVere White RW, Kung HJ, Evans CP, Gao AC. MicroRNA *let-7c* is downregulated in prostate cancer and suppresses prostate cancer growth. *PLoS One*. 2012;7(3):e32832. doi: 10.1371/journal.pone.0032832. Epub 2012 Mar 30. PMID: 22479342; PMCID: PMC3316551.

[23] Mulholland EJ, Green WP, Buckley NE, McCarthy HO. Exploring the Potential of MicroRNA *Let-7c* as a Therapeutic for Prostate Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019 Dec 6;18:927-937. doi: 10.1016/j.omtn.2019.09.031. Epub 2019 Oct 23. PMID: 31760377; PMCID: PMC6883330.

[24] Kurniawati I, Liu MC, Hsieh CL, Do AD, Sung SY. Targeting Castration-Resistant Prostate Cancer Using Mesenchymal Stem Cell Exosomes for Therapeutic *MicroRNA-let-7c* Delivery. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2022 Sep 6;27(9):256. doi: 10.31083/j.fbl2709256. PMID: 36224011.

[25] Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis*. 2019 Feb 21;10(3):177. doi: 10.1038/s41419-019-1407-6. PMID: 30792387; PMCID: PMC6384907.

[26] Eichhorn SW, Guo H, McGeary SE, Rodriguez-Mias RA, Shin C, Baek D, Hsu SH, Ghoshal K, Villén J, Bartel DP. mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Mol Cell*. 2014 Oct 2;56(1):104-15. doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.028. Epub 2014 Sep 25. PMID: 25263593; PMCID: PMC4292926.

[27] Li Y, Wang P, Wu LL, Yan J, Pang XY, Liu SJ. *miR-26a-5p* Inhibit Gastric Cancer Cell Proliferation and Invasion Through Mediated Wnt5a. *Onco Targets Ther*. 2020 Mar 27;13:2537-2550. doi: 10.2147/OTT.S241199. PMID: 32273724; PMCID: PMC7108881.

[28] Zhu WJ, Yan Y, Zhang JW, Tang YD, Han B. Effect and Mechanism of *miR-26a-5p* on Proliferation and Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Cancer Manag Res*. 2020 Apr 30;12:3013-3022. doi: 10.2147/CMAR.S237752. PMID: 32431544; PMCID: PMC7200261.

[29] Ye MF, Lin D, Li WJ, Xu HP, Zhang J. *MiR-26a-5p* Serves as an Oncogenic MicroRNA in Non-Small Cell Lung Cancer by Targeting FAF1. *Cancer Manag Res*. 2020 Aug 11;12:7131-7142. doi: 10.2147/CMAR.S261131. PMID: 32848467; PMCID: PMC7431172.

- [30] Chen J, Zhang K, Xu Y, Gao Y, Li C, Wang R, Chen L. The role of *microRNA-26a* in human cancer progression and clinical application. *Tumour Biol.* 2016 Jun;37(6):7095-108. doi: 10.1007/s13277-016-5017-y. Epub 2016 Apr 2. PMID: 27039398.
- [31] Guo K, Zheng S, Xu Y, Xu A, Chen B, Wen Y. Loss of *miR-26a-5p* promotes proliferation, migration, and invasion in prostate cancer through negatively regulating SERBP1. *Tumour Biol.* 2016 Sep;37(9):12843-12854. doi: 10.1007/s13277-016-5158-z. Epub 2016 Jul 23. PMID: 27449037.
- [32] Zhao S, Ye X, Xiao L, Lian X, Feng Y, Li F. et al. *MiR-26a* inhibits prostate cancer progression by repression of Wnt5a. *Tumour Biol.* 2014;35:9725-33
- [33] Rizzo M, Berti G, Russo F, Fazio S, Evangelista M, D'Aurizio R, Pellegrini M, Rainaldi G. Discovering the *miR-26a-5p* Targetome in Prostate Cancer Cells. *J Cancer.* 2017 Aug 22;8(14):2729-2739. doi: 10.7150/jca.18396. PMID: 28928862; PMCID: PMC5604205.
- [34] Hashemi GN, Najafi M, Salehi E, Farhood B, Mortezaee K. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J Cell Physiol.* 2019 May;234(5):5683-5699. doi: 10.1002/jcp.27411. Epub 2018 Oct 20. PMID: 30341914.
- [35] Zhang YQ, Chen X, Fu CL, Zhang W, Zhang DL, Pang C, Liu M, Wang JY. FENDRR reduces tumor invasiveness in prostate cancer PC-3 cells by targeting CSNK1E. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019 Sep;23(17):7327-7337. doi: 10.26355/eurrev\_201909\_18838. PMID: 31539119.
- [36] Chen Y, Zhou X, Wu Y. The *miR-26a-5p*/IL-6 axis alleviates sepsis-induced acute kidney injury by inhibiting renal inflammation. *Ren Fail.* 2022 Dec;44(1):551-561. doi: 10.1080/0886022X.2022.2056486. PMID: 35491874; PMCID: PMC9067948.
- [37] Lu Y, Liu M, Guo X, Wang P, Zeng F, Wang H, Tang J, Qin Z, Tao T. *miR-26a-5p* alleviates CFA-induced chronic inflammatory hyperalgesia through Wnt5a/CaMKII/NFAT signaling in mice. *CNS Neurosci Ther.* 2023 May;29(5):1254-1271. doi: 10.1111/cns.14099. Epub 2023 Feb 8. PMID: 36756710; PMCID: PMC10068476.
- [38] Yang L., Yang L., Wang S., Zhao E., Lu T., Liang Q. Effects of *miR-155* on IL-1 $\beta$ -induced apoptosis, inflammatory response and oxidative stress of nucleus pulposus cells in rats. *Acta Universitatis Medicinalis .* 2020;55(7):1046–1051.
- [39] Liu Z. Q., Feng J., Shi L. L., Xu J., Zhang B. J., Chen L. J. Influences of *miR-155*/NF- $\kappa$ B signaling pathway on inflammatory factors in ARDS in neonatal pigs. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences .* 2019;23(16).

- [40] Yao LY, Ma J, Zeng XM, Ou-Yang J. *MicroRNA-155-5p* inhibits the invasion and migration of prostate cancer cells by targeting SPOCK1. *Oncol Lett.* 2020 Dec;20(6):353. doi: 10.3892/ol.2020.12215. Epub 2020 Oct 11. PMID: 33123264; PMCID: PMC7586282
- [41] Santo GD, Frasca M, Bertoli G, Castiglioni I, Cava C. Identification of key miRNAs in prostate cancer progression based on miRNA-mRNA network construction. *Comput Struct Biotechnol J.* 2022 Feb 7;20:864-873. doi: 10.1016/j.csbj.2022.02.002. PMID: 35222845; PMCID: PMC8844601.
- [42] Xiaodong M et al. MicroRNAs in NF- $\kappa$ B signaling, *Journal of Molecular Cell Biology*, Volume 3, Issue 3, June 2011, Pages 159–166, <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjr007>
- [43] Yang L., Yang L., Wang S., Zhao E., Lu T., Liang Q. Effects of *miR-155* on IL-1 $\beta$ -induced apoptosis, inflammatory response and oxidative stress of nucleus pulposus cells in rats. *Acta Universitatis Medicinalis .* 2020;55(7):1046–1051.
- [44] Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2006 Sep;25(3):409-16. doi: 10.1007/s10555-006-9005-3. PMID: 16951987.
- [45] Schröder SK, Asimakopoulou A, Tillmann S, Koschmieder S, Weiskirchen R. TNF- $\alpha$  controls Lipocalin-2 expression in PC-3 prostate cancer cells. *Cytokine.* 2020 Nov;135:155214. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155214. Epub 2020 Jul 24. PMID: 32712458.
- [46] Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol.* 2014 Jun;26(3):253-66. doi: 10.1016/j.smim.2014.05.004. Epub 2014 Jun 21. PMID: 24958609; PMCID: PMC4156877.
- [47] KALLIOLIAS, GD; IVASHKIV, LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*, v.12, n.1, p.49-62, 2016. doi: 10.1038/nrrheum.2015.169.
- [48] Cochetti G, Poli G, Guelfi G, Boni A, Egidi MG, Mearini E. Different levels of serum microRNAs in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: evaluation of potential diagnostic and prognostic role. *Onco Targets Ther.* 2016 Dec 13;9:7545-7553. doi: 10.2147/OTT.S119027. PMID: 28008272; PMCID: PMC5167485.

## CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE

O presente estudo como um todo foi de grande importância para a investigação das ações do tempol sobre diversos contextos do CaP, aspectos desconhecidos até o momento. Foi possível hipotetizar, em diversos níveis de processos biológicos, partindo da expressão gênica até os níveis proteicos encontrados no tecido prostático, passando pela possível regulação dos mesmos, a ação desse nitróxido em diferentes abordagens metodológicas para o estudo desse tipo de câncer.

Sumarizando os resultados dos três artigos científicos, temos que o tempol no câncer de próstata:

- Teve ação antiproliferativa, diminuindo a viabilidade celular das linhagens tumorais estudadas;

- Teve ação quimiopreventiva, atrasando a progressão das lesões prostáticas no modelo TRAMP, tanto no estágio inicial quanto avançado estudados;

- Regulou positivamente miRNAs relacionados aos processos de sobrevivência celular, indicando provável silenciamento gênico e aumento da morte celular.

- Teve importante ação anti-inflamatória, diminuindo o início da cascata de sinalização inflamatória, principalmente por diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$ , ou aumentando inibidores de NF $\kappa$ B;

- Teve ação antioxidante importante, não alterando níveis de catalase, mas agindo, por vezes, de forma a suprir sua necessidade de aumento;

- Atuou nos componentes da fosforilação oxidativa, principalmente no estágio avançado;

- Não apresentou resposta dose-dependente expressiva a níveis estruturais, apesar do dobro da dose alterar diferencialmente os níveis de expressão gênica.

Finalizando, conclui-se, portanto, este extenso estudo com sucesso, colocando o tempol como uma terapia promissora para o CaP, que, no entanto, apresenta algumas ressalvas na sua utilização. Devido a sua ação multifacetada, deve se ponderar seu uso com base no estágio de progressão da lesão bem como no grau de dependência androgênica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABATE-SHEN, C.; SHEN, MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.* Oct 1, v.14, n.19, p.2410-2434, 2000.

AHMED-AMAR. et al. Determination of oxidative stress levels and some antioxidant enzyme activities in prostate cancer. *The Aging Male*, v. 22, n. 3, p. 198-206, 2019.

ALVES, L. F., DA SILVA, R. F., & CAGNON, V. H. A. (2018). Nintedanib effects on delaying cancer progression and decreasing COX-2 and IL-17 in the prostate anterior lobe in TRAMP mice. *Tissue and Cell*, 50(December 2017), 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2017.12.008>

AUGUSTO et al., Cyclic nitroxides inhibit the toxicity of nitric oxide-derived oxidants: mechanisms and implications. *An Acad Bras Cienc*, v.80, n.1, p.179-189, 2008.

AUMÜLLER, G.; SEITZ, J. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. In: *International review of cytology*. Academic Press, 1990. p. 127-231.

BADIA, E. et al. Effect of tamoxifen and fulvestrant long-term treatments on ROS production and (pro/anti)-oxidant enzymes mRNA levels in a MCF-7-derived breast cancer cell line. *Breast Cancer*. 2016 Sep;23(5):692-700. doi: 10.1007/s12282-015-0626-7. Epub 2015 Jul 21

BAKER, A.M., OBERLEY, L.W., COHEN, M. B. Expression of antioxidant enzymes in human prostatic adenocarcinoma. *Prostate*1997;32:229–33.

BALKWILL F, MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, v. 357, p.539-45, 2001.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97.

BERMAN-BOOTY, L. D. et al. (2012). A Review of the Existing Grading Schemes and a Proposal for a Modified Grading Scheme for Prostatic Lesions in TRAMP Mice. *Toxicologic Pathology*, 40(1), 5–17. <https://doi.org/10.1177/0192623311425062>

BERNS, EM, BOER W, MULDER E. Androgen-dependent growth regulation of and release of specific protein(s) by the androgen receptor containing human prostate tumor cell line LNCaP. *Prostate*. 1986;9(3):247-59. doi: 10.1002/pros.2990090305.



BONINI, M.G., MASON, R. P., AUGUSTO, O. The mechanism by which 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempol) diverts peroxyxynitrite decomposition from nitrating to nitrosating species. *Chem. Res. Toxicol.* 2002, 15, 506-511

BOST, F.; KAMINSKI, L. The metabolic modulator PGC-1 $\alpha$  in cancer. *Am J Cancer Res* 2019;9(2):198-211.

BOSTWICK D. G., et al. Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer* 2000;89:123–34.

BULL, J.H., et al. Identification of potential diagnostic markers of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia using cDNA microarray. *Br. J. Cancer.*, v. 84, n.11, p.1512-1519, 2001

CAI, T.; SANTI, R.; TAMANINI, i.; et al., Current Knowledge of the Potential Links between Inflammation and Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug; 20(15): 3833. doi: 10.3390/ijms20153833

CARDANO,M; TRIBIOLI, C; PROSPERI, E. Targeting proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an effective strategy to inhibit tumor cell proliferation. *Curr Cancer Drug Targets.* 2020;20(4):240-252. doi: 10.2174/1568009620666200115162814.

CAVAZOS, F. Fine structure and functional correlates of male accessory sex glands of rodents. In: GREEP, R.O.; STWOOD, E.B. (Eds). *Handbook of Physiology.* Washington: American Physiological Society, pp.353-381,1975.

CHEN, W. L. et al. Cycling hypoxia induces chemoresistance through the activation of reactive oxygen species-mediated B-cell lymphoma extra-long pathway in glioblastoma multiforme. *J Transl Med.* 2015 Dec 28;13:389. doi: 10.1186/s12967-015-0758-8.

CHEN, X. et al. Acute antihypertensive action of tempol in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol*, 293 (2007), pp. H3246-H3253

CHENG C.-F., KU H.-C., LIN H. PGC-1 $\alpha$  as a pivotal factor in lipid and metabolic regulation. *International Journal of Molecular Sciences.* 2018;19(11, article 3447) doi: 10.3390/ijms19113447

CHIAROTTO, G. B. et al. Tempol improves neuroinflammation and delays motor dysfunction in a mouse model (SOD1(G93A)) of ALS. *J Neuroinflammation.* 2019 Nov 14;16(1):218. doi: 10.1186/s12974-019-1598-x.

CHIAVEROTTI, T., et al. Dissociation of epithelial and neuroendocrine carcinoma lineages in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model of prostate cancer. *Am. J. Pathol.*, v.172, n.1, p.226-246, 2008.

CONSTANTINO, L.; BARLOCCO, D. STAT-3 as a target for cancer drug discovery. *Curr Med Chem.* 2008;15(9):834-43. doi: 10.2174/092986708783955464.

COTRIM, Ana P. et al. Kinetics of tempol for prevention of xerostomia following head and neck irradiation in a mouse model. *Clinical cancer research*, v. 11, n. 20, p. 7564-7568, 2005.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature*, v.420, p.860-867, 2002.

CULIG, Z. Proinflammatory cytokine interleukin-6 in prostate carcinogenesis. *Am J Clin Exp Urol.* 2014; 2(3): 231–238.

CUNHA, G. R.; SINCLAIR, A.; RICKE, W. A.; ROBBOY, S. J.; CAO, M.; BASKIN, L. S. Reproductive tract biology: Of mice and men. *Differentiation*, v.110, p.49-63, 2019. doi: 10.1016/j.diff.2019.07.004.

CUNHA, G.R.; ALARID, E.T.; TURNER, T.; DONJACOUR, A.A.; BOUNTIN, E.L.; FOSTER, B.A. Normal and abnormal development of the male urogenital tract. Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. *J Androl.*; v.13, p.465-475, 1992.

CUNHA, G.R.; MATRISIAN, L.M. It's not my fault, blame it on my microenvironment. *Differentiation*, v.70, p.469-472, 2002.

CUNHA, Gerald R. et al. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *International journal of cancer*, v. 107, n. 1, p. 1-10, 2003.

CUZZOCREA, S., et al. Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Shock*, 14 (2), 150–156, 2000.

CUZZOCREA, S., PISANO, B., DUGO, L., IANARO, A., PATEL, N. S., CAPUTI, A. P., THIEMERMANN, C. Tempol reduces the activation of nuclear factor- $\kappa$ B in acute inflammation. *Free Radical Res.* 38, 813–819, 2004.

D'SOUZA, L. et al. Oxidative stress and cancer development: are noncoding rnas the missing links? *Antioxidants & redox signaling.* 2020, Mary Ann Liebert, Inc. doi: 10.1089/ars.2019.7987

DE MARZO, A. M., COFFE, D. S., NELSON, W.G. New concepts in tissue specificity for prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Urology* 1999; 53: 29-40.

De NUNZIO, C., et al. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *Eur. Urol.*, v.60, n.1, p.106-117, 2011.

DI, P. R. et al. (2005). Effects of Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model periodontitis. *J Clin Periodontol* 32, 1062–1068.

DURAND, JK.; BALDWIN, AS. Targeting iKK and NFκB for therapy. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2017;107:77-115. doi: 10.1016/bs.apcsb.2016.11.006.

ERKER, L. et al. Cancer chemoprevention by the antioxidant tempol acts partially via the p53 tumor suppressor. *Hum Mol Genet.* 2005 Jun 15;14(12):1699-708. doi: 10.1093/hmg/ddi181. Epub 2005 May 11.

EWEEES, M. G. Tempol, a superoxide dismutase mimetic agent, reduces cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Drug Chem Toxicol.* 2018 Aug 1:1-8. doi: 10.1080/01480545.2018.1485688.

FISHBEIN, A. et al. Carcinogenesis: Failure of resolution of inflammation? *Pharmacol Ther.* 2020 Sep 3;107670. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107670.

FOCHI, RICARDO A. ; SANTOS, FERNANDA C. A. ; GOÉS, REJANE M. ; TABOGA, SEBASTIÃO R. Progesterone as a morphological regulatory factor of the male and female gerbil prostate. *International Journal of Experimental Pathology. International Journal of Experimental Pathology.* 2013; 94(6): 373

FULDA, S. Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy. *Planta Med.* 2010 Aug;76(11):1075-9. doi: 10.1055/s-0030-1249961. Epub 2010 May 19.

FURQUAN, M. et al. STAT inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol.* 2013 Dec 5;6:90. doi: 10.1186/1756-8722-6-90.

FURTEK, SL. et al. Strategies and Approaches of Targeting STAT3 for Cancer Treatment. *ACS Chem Biol.* 2016 Feb 19;11(2):308-18. doi: 10.1021/acscchembio.5b00945. Epub 2016 Jan 15.

GARIBOLDI MB, RAVIZZA R, PETTERINO C, CASTAGNARO M, FINOCCHIARO G, MONTI E. STUDY of *in vitro* and *in vivo* effects of the piperidine nitroxide Tempol—a potential new therapeutic agent for gliomas. *Eur J Cancer* 2003;39:829–37.

GARIBOLDI, M.B. et al. Antiproliferative effect of the piperidine nitroxide TEMPO on neoplastic and nonneoplastic mammalian cell lines. *Free Radic Biol Med* 1998;24:913–23.

GARRAWAY, L.A., et al. Intermediate basal cells of the prostate: *in vitro* and *in vivo* characterization. *Prostate*, v.55, n.3, p.206-218, 2003.

GASPARIAN, AV. et al. The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci.* 2002 Jan 1;115(Pt 1):141-51.

GAUDET, A. D. et al. MicroRNAs: Roles in Regulating Neuroinflammation. *The Neuroscientist*, p. 107385841772115, 2017.

GELAIN, D. P. et al. A systematic review of human antioxidant genes. *Front Biosci* 2009;14:4457–63.

GHOSH, S; MAY, MJ; KOPP, EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-60. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.225.

GINGRICH, J. R. et al. Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. *Prostate cancer and prostatic diseases*, v. 2, n. 2, p. 70-75, 1999.

GONZAGA, A. C. R. ; SILVA, G. H. C. ; GOMES, H. W. ; CORDEIRO, J. D. M. ; SANTOS, L. C. ; MAHECHA, Germán A B ; SANTOS, M. M. ; OLIVEIRA, Cleida Aparecida . Profile of cell proliferation and apoptosis activated by the intrinsic and extrinsic pathways in the prostate of aging rats. *PROSTATE*, v. 77, p. 937-948, 2017.

GONZALEZ-REYES S, FERNANDEZ JM, GONZALEZ LO, AGUIRRE A, SUAREZ A, GONZALEZ JM, et al. Study of TLR3, TLR4, and TLR9 in prostate carcinomas and their association with biochemical recurrence. *Cancer Immunol Immunother* (2011) 60(2):217–26. doi:10.1007/s00262-010-0931-0.

GREENBERG, N. M. et al. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 92, n. 8, p. 3439-3443, 1995.

GREENWALD, M.B.Y., ANZI, S., SASSON, S., BIANCO-PELED, H., KOHEN, R. Can nitroxides evoke the Keap1 – Nrf2 – ARE pathway in skin ? *Free Radic Biol Med* 2014;77:258–69.

GREENWALD, M.B.Y., FRUŠIĆ-ZLOTKIN, M., SOROKA, Y., SASSON, S., BIANCO-PELED, H., BITTON, R., et al. Nitroxide delivery system for Nrf2 activation and skin protection. *Eur J Pharm Biopharm* 2015;94:123–34.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, v.140, n. 6, p.883-99, 2010. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025.

GU, L. et al. Pharmacological suppression of JAK1/2 by JAK1/2 inhibitor AZD1480 potently inhibits IL-6-induced experimental prostate cancer metastases formation. *Mol Cancer Ther.* 2014 May; 13(5): 1246–1258.

HADDAD, J. Redox regulation of pro-inflammatory cytokines and I $\kappa$ B-alpha/NF-kappaB nuclear translocation and activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Aug 30;296(4):847-56. doi: 10.1016/s0006-291x(02)00947-6.

HAHN, Stephen M. et al. Identification of nitroxide radioprotectors. *Radiation research*, v. 132, n. 1, p. 87-93, 1992.

HAHN, Stephen M. et al. Tempol, a stable free radical, is a novel murine radiation protector. *Cancer research*, v. 52, n. 7, p. 1750-1753, 1992.

HALL, E. D.; VAISHNAV, R. A.; MUSTAFA, A. G. Antioxidant therapies for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, v.7, n.1, p.51-61, 2010. doi: 10.1016/j.nurt.2009.10.021.

HAMID, A.R.; UMBAS, R.; MOCHTAR, C.A. Recent role of inflammation in prostate diseases: chemoprevention development opportunity. *Acta Med. Indones.*, v.43, 1, 59-65, 2011.

HAMID, A.R.; UMBAS, R.; MOCHTAR, C.A. Recent role of inflammation in prostate diseases: chemoprevention development opportunity. *Acta Med. Indones.*, v.43, 1, 59-65, 2011.

HATANO, K.; FUJITA, K.; NONOMURA, N. Application of Anti-Inflammatory Agents in Prostate Cancer. *J Clin Med.*, v.9, n.8, 2020.2680. doi: 10.3390/jcm9082680.

HAYWARD, S.W.; CUNHA, G.R. The prostate: development and physiology. *Radiol.Clin.NorthAm.*, v.38, n.1, p.1-14, 2000.

HERMES, T. A. et al. Tempol treatment shows phenotype improvement in mdx mice. *PLoS One.* 2019 Apr 22;14(4):e0215590. doi: 10.1371/journal.pone.0215590. eCollection 2019.

HERMES, TA. et al. Tempol improves redox status in mdx dystrophic diaphragm muscle. *Int J Exp Pathol.* 2020 Dec;101(6):289-297. doi: 10.1111/iep.12376. Epub 2020 Oct 24.

HOROSZEWICZ, J.S. et al. The Incap cell line—a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1980, 37, 115–132.

HSING, A.W. Hormones and prostate cancer: What's next? *Epidemiol.Rev.*, v.23, n.1, p.42-58, 2001.

HSU, A. L., CHING, T. T., WANG, D. S., SONG, X., VIVEK, M., RANGNEKAR, V. M., CHEN, C. S. The Cyclooxygenase-2 inhibitor Celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem.* 2000;275(15):11397–403

HU, J. et al. Anticancer effect of icaritin on prostate cancer via regulating *miR-381-3p* and its target gene UBE2C. *Cancer Med.* 2019 Dec;8(18):7833-7845. doi: 10.1002/cam4.2630.

HUA D, LIU MY, CHENG ZD, QIN XJ, ZHANG HM, CHEN Y, et al. Small interfering RNA-directed targeting of toll-like receptor 4 inhibits human prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity. *Mol Immunol* (2009). 46(15):2876–84. doi:10.1016/j.molimm.2009.06.016.

HUANG B, ZHAO J, LI H, HE KL, CHEN Y, CHEN SH, et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res* (2005) 65(12):5009–14. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0784

INCA. Câncer de Próstata. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>>. Acesso em: 06 fev. 2020.

JESIK, C. J.; HOLLAND, J. M.; LEE, C. An anatomic and histologic study of the rat prostate. *The prostate*, v. 3, n. 1, p. 81-97, 1982.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica: texto e atlas*. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAIGHN, M.E.; NARAYAN, K.S.; OHNUKI, Y.; LECHNER, J.F.; JONES, L.W. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (pc-3). *Invest. Urol.* 1979, 17, 16–23.

KALLIOLIAS, GD; IVASHKIV, LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol.* 2016 Jan;12(1):49-62. doi: 10.1038/nrrheum.2015.169. Epub 2015 Dec 10.

- KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:621-63. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.621.
- KAWAKAMI, T. et al. Superoxide dismutase analog (Tempol: 4-hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine 1-oxyl) treatment restores erectile function in diabetes-induced impotence. *Int J Impot Res.* Nov-Dec 2009;21(6):348-55. doi: 10.1038/ijir.2009.28. Epub 2009 Jun 25.
- KIDO, L. A.; LAMAS, C. A.; MARÓSTICA, M. R.; CAGNON, V. H. Q. Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP) model: A good alternative to study PCa progression and chemoprevention approaches. *Life Sciences*, v. 217, p 141-7, 2019. doi: 10.1016/j.lfs.2018.12.002.
- KIRSCHENBAUM, A., LIU, X.-H., YAO, S., & LEVINE, A. C. (2001). The role of cyclooxygenase-2 in prostate cancer. Retrieved from <https://ac.els-cdn.com/S0090429501012559/1>.
- KONIG, J. E.; SENGE, T.; ALLHOFF, E. P., KONIG, W. Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *The Prostate.* 2004; 58:121-9.
- KRISHNA, M. C., AND SAMUNI, A. Nitroxides as antioxidants. *Methods Enzymol.*, v.274, p.580-589, 1994.
- KRZYMINIEWSKI, R. et al. ESR Method in monitoring of nanoparticle endocytosis in cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 4388; doi:10.3390/ijms21124388.
- KURIHARA, N., YANAGISAWA, H., SATO, M., TIEN, C. K., WADA, O. (2002). Increased renal vascular resistance in zinc-deficient rats: role of nitric oxide and superoxide. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29, 1096–1104.
- LABANCA, E. et al: Association of HO-1 and BRCA1 is critical for the maintenance of cellular homeostasis in prostate cancer. *Mol Cancer Res* 13: 1455-1464, 2015.
- LEAV I. et al. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am. J. Pathol.*; v.159, p.79-92, 2001.
- LEHMAN J. J., BOUDINA S., BANKE N. H., et al. The transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  is essential for maximal and efficient cardiac mitochondrial fatty acid oxidation and lipid

homeostasis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2008;295(1):H185–H196.

LEJEUNE, D. et al. The superoxide scavenger TEMPOL induces urokinase receptor ( uPAR ) expression in human prostate cancer cells. *Mol Cancer*. 2006 Jun 6;5:21. doi: 10.1186/1476-4598-5-21.

LI, M. et al. Targeting reactive nitrogen species suppresses hereditary pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Jul 3;114(27):7106-7111.

LI, Q; VERMA, IM. The nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)/REL family. *Nat Rev Immunol*. 2002 Oct;2(10):725-34. doi: 10.1038/nri910.

LIN, C.Q.; BISSELL, M.J. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J*, v.7, n.9, p.737-743, 1993.

LIU, Y. et al., Tempol protects cardiomyocytes from nucleoside reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Toxicol Sci*, v.139, n.1, p.133-141, 2014. doi: 10.1093/toxsci/kfu034.

LUGRIN, J. et al. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol Chem*. 2014;395(2):203–230.

LUO, Z., CHEN, Y., CHEN, S., WELCH, W. J., ANDRESEN, B. T., JOSE, P. A., ET AL. Comparison of inhibitors of superoxide generation in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 157, 935–943, 2009.

MALINOWSKA, K. et al. Interleukin-6 stimulation of growth of prostate cancer *in vitro* and *in vivo* through activation of the androgen receptor. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16: 155-69

MCNEAL, J.E. Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.*, v.12, n.8, p.619-633, 1988.

METZ, J. M. et al. A phase I study of topical Tempol for the prevention of alopecia induced by whole brain radiotherapy. *Clin Cancer Res*. 2004 Oct 1;10(19):6411-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0658.

MINAMI, S. B. et al. Creatine and tempol attenuate noise-induced hearing loss. *Brain Res*, 1148 (2007), pp. 83-89.



MIRANDA, R. C. et al. MicroRNAs: Master regulators of ethanol abuse and toxicity? *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 34, n. 4, p. 575–587, 2010.

MIURA, Y., UTSUMI, H., HAMADA, A. Antioxidant activity of nitroxide radicals in lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.300, p. 148-156, 1993.

MORAIS-SANTOS, MONICA ; WERNECK-GOMES, HIPÁCIA ; CAMPOLINA-SILVA, GABRIEL H ; SANTOS, LETICIA C ; MAHECHA, GERMAN, A B; HESS, REX A ; OLIVEIRA, CLEIDA A . Basal cells show increased expression of aromatase and estrogen receptor  $\alpha$  in prostate epithelial lesions of male aging rats. *ENDOCRINOLOGY*, v. 159, p. 723-732, 2018.

MUSCOLI, C. et al. On the selectivity of superoxide dismutasemimetics and its importance in pharmacological studies. *Br J Pharmacol* 2003;140: 445–60.

NAMEKAWA, T. et al. Application of prostate cancer models for preclinical study: advantages and limitations of cell lines, patient-derived xenografts, and three-dimensional culture of patient-derived cells. *Cells*. 2019 Jan 20;8(1):74. doi: 10.3390/cells8010074.

NARAYANAN, K. N. Inflammatory processes of prostate tissue microenvironment drive rat prostate carcinogenesis: preventive effects of celecoxib. *The Prostate* 69: 133-141 (2009).

NEVALAINEN, M. T., VALVE, E. M., MÄKELÄ, S. I., BLÄUER, M., TUOHIMAA, P. J., & HÄRKÖNEN, P. L. (1991). Estrogen and Prolactin Regulation of Rat Dorsal and Lateral Prostate in Organ Culture. *Endocrinology*, 129(2), 612–622. <https://doi.org/10.1210/endo-129-2-612>

NGUYEN, D. P.; SHALINI, J.; YADAV, S. TEWARI, A. K. Recent insights into NF- $\kappa$ B signalling pathways and the link between inflammation and prostate cancer. *BJU Int.*, v.114, n.2, p.168-176, 2014. doi: 10.1111/bju.12488.

OFFER, T., RUSSO, A., AND SAMUNI, A. The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD mimics *FASEB J.*,v.14, 1215-1223, 2000

OHTAKE, Shinji et al. Oxidative stress marker 8-hydroxyguanosine is more highly expressed in prostate cancer than in benign prostatic hyperplasia. *Molecular and clinical oncology*, v. 9, n. 3, p. 302-304, 2018.

OLIVEIRA, Daniel SM et al. The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. *Bosnian journal of basic medical sciences*, v. 16, n. 1, p. 8, 2016.

- OU, T; LILLY, M; JIANG, W. The Pathologic Role of Toll-Like Receptor 4 in Prostate Cancer Front. Immunol. 06 June 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01188>.
- PAHL, HL. Activators and target genes of Rel/NF-kB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6853–6866.
- PALAYOOR, ST et al. Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene*. 1999 Dec 2;18(51):7389-94. doi: 10.1038/sj.onc.1203160.
- PATEL, K. et al. Acute antihypertensive action of nitroxides in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290 (2006), pp. R37-R43
- PATTISON DI, LAM M, SHINDE SS, ANDERSON RF, DAVIES MJ. The nitroxide TEMPO is na 614 efficient scavenger of protein radicals: Cellular and kinetic studies. *Free Radic Biol Med*, v.615, p.1664–74, 2012.
- PATTISON DI, LAM M, SHINDE SS, ANDERSON RF, DAVIES MJ. The nitroxide TEMPO is na 614 efficient scavenger of protein radicals: Cellular and kinetic studies. *Free Radic Biol Med*, v.615, p.1664–74, 2012.
- PAULIS, G. Inflammatory mechanisms and oxidative stress in prostatitis: the possible role of antioxidant therapy. *Res Rep Urol*. 2018; 10: 75–87. Published online 2018 Sep 17. doi: 10.2147/RRU.S170400c
- PENNA, S.L.D., ROSON, M. I., TOBLLI, J. E., FERNÁNDEZ, B.E. Role of angiotensin II and oxidative stress in renal inflammation by hypernatremia: benefits of atrial natriuretic peptide, losartan, and tempol. *Free Radic Res*. 2015 Apr;49(4):383-96. doi: 10.3109/10715762.2015.1006216. Epub 2015 Mar 6.
- PERLETTI G., MONTI E., MAGRI V., CAI T., CLEVES A., TRINCHIERI A., MONTANARI E. The association between prostatitis and prostate cancer. Systematic review and meta-analysis. *Arch. Ital. Urol. Androl*, v.89, p.259-265, 2017. doi: 10.4081/aiua.2017.4.259.
- PLATI, J.; BUCUR, O.; KHOSRAVI-FAR. Dysregulation of Apoptotic Signaling in Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *J Cell Biochem*. 2008 Jul 1; 104(4): 1124–1149.

POLYTARCHOU, C., PAPADIMITRIOU, E. Antioxidants inhibit angiogenesis *in vivo* through down-regulation of nitric oxide synthase expression and activity. *Free Radic Res*, 38 (2004), pp. 501-508.

PRICE, D.; WILLIAMS-ASHMAN, H.G. The accessory reproductive Sex glands in mammals. In: Young W.C. (ed.). *Sex and internal secretions*. Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, v.1, pp.488, 1961.

QUAN, HH. Et al. Tempol reduces injury area in rat model of spinal cord contusion injury through suppression of iNOS and COX-2 expression. *Neurol Sci*. 2013 Sep;34(9):1621-8. doi: 10.1007/s10072-013-1295-y. Epub 2013 Jan 25.

QUEIROZ, R. F., CUNHA, A. C., FERREIRA, V.F., JORD, A.K., MALVEZZI, A., AMARAL, A.T., et al. Nitroxides attenuate carrageenan-induced inflammation in rat paws by reducing neutrophil infiltration and the resulting myeloperoxidase-mediated damage. *Free Radic Biol Med.*, v.625, p.1942-53, 2012.

QUEIROZ, R.F., VAZ, S.M., AUGUSTO, O. Inhibition of the chlorinating activity of myeloperoxidase by tempol: revisiting the kinetics and mechanisms. *Biochem J*, v.431, p.423–31, 2011.

RACHMILEWITZ, D. et al. A novel antiulcerogenic stable radical prevents gastric mucosal lesions in rats. *Gut*, v.35, n.9 p. 1181-8, 1994. doi: 10.1136/gut.35.9.1181

REES, M.D., BOTTLE, S.E., FAIRFULL-SMITH, K.E., MALLE, E., WHITELOCK, J.M., DAVIES, M.J. Inhibition of myeloperoxidase-mediated hypochlorous acid production by nitroxides. *Biochem J*. 2009;421:79–86.

RILEY, D. P. et al. Synthesis, characterization and stability of manganese (II) C-substituted 1,4,7,10,13- pentaazacyclopentadecane complexes exhibiting superoxide dismutase activity. *Inorg. Chem.* 35, 5213–5231 (1996)

RIUS-PÉREZ, S. et al. PGC-1  $\alpha$ , Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Mar 9;2020:1452696. doi: 10.1155/2020/1452696. eCollection 2020.

ROEHRBORN, C., MCCONNELL, J. Etiology, pathophysiology, epidemiology and natural history of benign prostatic hyperplasia. In: Walsh P, Retik A, Vaughan E, Wein A, editors. *Campbell's Urology*. 8th ed. Philadelphia: Saunders; 2002. pp. 1297–1336.

ROOS, WP.; THOMAS, AD.; KAINA, B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer*. 2016 Jan;16(1):20-33. doi: 10.1038/nrc.2015.2. Epub 2015 Dec 18.

SABROE, I; DOWER, SK; WHYTE, MKB. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis*. 2005 Nov 15;41 Suppl 7:S421-6. doi: 10.1086/431992.

SALVEMINI, D., RILEY, D. P., & CUZZOCREA, S. (2002). SOD mimetics are coming of age. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(5), 367–374. <https://doi.org/10.1038/nrd796>

SAMUNI A, MITCHELL JB, DEGRAFF W, KRISHNA CM, SAMUNI U, RUSSO A. Nitroxide SOD612 mimics: modes of action. *Free Radic Res Commun*, 1991.

SAMUNI, Y., SAMUNI. U., GOLDSTEIN, S. The use of cyclic nitroxide radicals as HNO scavengers. *J Inorg Biochem.*, v.118, p.155-61, 2013. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.10.002.

SCHÖPF, B. et al. OXPHOS remodeling in high-grade prostate cancer involves mtDNA mutations and increased succinate oxidation. *Nat Commun*. 2020 Mar 20;11(1):1487. doi: 10.1038/s41467-020-15237-5.

SCIARRA, A., et al. Prostate growth and inflammation. *J. Steroid. Biochem.*, v.108, n.3-5, p.254-260, 2008.

SEABRA, AB.; Durán, N. Nitric oxide donors for prostate and bladder cancers: Current state and challenges. *Eur J Pharmacol*. 2018 May 5;826:158-168. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.02.040. Epub 2018 Mar 1.

SEATON, A. et al. Interleukin-8 signaling promotes androgen-independent proliferation of prostate cancer cells via induction of androgen receptor expression and activation. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1148-56

SHASHNI, B.; NISHIKAWA, Y.; NAGASAKI. Management of tumor growth and angiogenesis in triple-negative breast cancer by using redox nanoparticles. *Biomaterials*. 2021 Feb;269:120645. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120645. Epub 2021 Jan 6.

SHI, C. et al. Aspirin inhibits IKK- $\beta$ -mediated prostate cancer cell invasion by targeting matrix metalloproteinase-9 and urokinase-type plasminogen activator. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;41:1313-1324.

SHIOTA M, YOKOMIZO A, TADA Y, INOKUCHI J, TATSUGAMI K, KUROIWA K, UCHIUMI T, FUJIMOTO N, SEKI N, NAITO S. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha interacts with the androgen receptor (AR) and promotes prostate cancer cell growth by activating the AR. *Mol Endocrinol*.

SHUKLA S, MACLENNAN GT, FU P et al. Nuclear factor-kappaB/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression. *Neoplasia* 2004; 6: 390–400

SHUKLA S, MACLENNAN GT, MARENGO SR, RESNICK MI, GUPTA S. Constitutive activation of PI3 K-Akt and NF-kappaB during prostate cancer progression in autochthonous transgenic mouse model. *Prostate* 2005; 64: 224–239.

SILVA, D. A., CORREIA, T. M. L., PEREIRA, R., SILVA, A., AUGUSTO, O., QUEIROZ, R.F. Tempol reduces inflammation and oxidative damage in cigarette smoke-exposed mice by decreasing neutrophil infiltration and activating the Nrf2 pathway, *Chemico-Biological Interactions*, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109210>.

SILVA, HNM. et al. Oxidative Stress, Inflammation, and Activators of Mitochondrial Biogenesis: Tempol Targets in the Diaphragm Muscle of Exercise Trained- mdx Mice. *Front Physiol*. 2021 Apr 26;12:649793. doi: 10.3389/fphys.2021.649793. eCollection 2021.

SINOWATZ, F. et al (1995). Effects of hormones on the prostate in adult and aging men and animals. *Microscopy Research and Technique*, 30(4), 282–292.

SLAYTER, M.V. et al. Histogenic of induced prostate and seminal vesicle carcinoma in Lobund-Wistar rats: a system for histological scoring and grading. *Cancer Res*; v.54, pp.1440-1445, 1994.

SOULE, B. P. et al. (2007). The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radic Biol Med* 42, 1632–1650.

SPEJO, A.B., TELES, C.B., ZUCCOLI, G.D.S., OLIVEIRA, A.L.R. Synapse preservation and decreased glial reactions following ventral root crush (VRC) and treatment with 4-hydroxy-tempo (TEMPOL). *J Neurosci Res*. 2019 Apr;97(4):520-534. doi: 10.1002/jnr.24365.

STAAL, J.; BEYAERT, R. Inflammation and NF-κB Signaling in Prostate Cancer: Mechanisms and Clinical Implications. *Cells* 2018, 7(9), 122; doi.org/10.3390/cells7090122

STEINER, G.E., et al. Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate. *Prostate.*, v.56, n.3, p.171-182, 2003

SUGIMURA, Y.; CUNHA, G. R.; DONJACOUR, A. A. Morphological and histological study of castration-induced degeneration and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. *Biology of reproduction*, v. 34, n. 5, p. 973-983, 1986.

SUTTIE, A. et al. A Grading Scheme for the Assessment of Proliferative Lesions of the Mouse Prostate in the TRAMP Model. *Toxicologic Pathology*. Volume 31, Issue 1, Pages 31 - 38 January 2003

TAKEDA, K; KAISHO, T; AKIRA, S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-76. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126. Epub 2001 Dec 19.

TEWARI, AK. et al. Inflammation and Prostate Cancer. *Cell & Molecular Biology of Prostate Cancer*. pp 41-65. September 2018.

THOMPSON, J. E., R. J. PHILLIPS, H. ERDJUMENTBROMAGE, P. TEMPST, and S. GHOSH. 1995. Ikappa B beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell*. 80: 573.

THOMAS, R.; SHARIFI, N. SOD mimetics: a novel class of androgen receptor inhibitors that suppresses castration-resistant growth of prostate cancer. *Mol. Cancer Ther*, v. 11, p. 87-97, 2012.

TOŁOCZKO-IWANIUK, N. et al. Celecoxib in Cancer Therapy and Prevention – Review. *Curr Drug Targets*. 2019;20(3):302-315. doi: 10.2174/1389450119666180803121737.

TORRANO, V. et al. The metabolic co-regulator PGC1alpha suppresses prostate cancer metastasis. *Nat Cell Biol*. 2016;18:645–656.

TUXHORN JA, AYALA GE, ROWLEY DR (2001) Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* 166: 2472-2483.

VAZ, S. M., AUGUSTO, O. The mechanism by which Tempol inhibits peroxidase-mediated protein nitration. *Free Radic Biol Med*, 2006.

VOLK, T. et al. Secretion of MCP-1 and IL-6 by cytokine stimulated production of reactive oxygen species in endothelial cells. *Mol and Cel Biochemistry*, 206(1–2), 105–112. (2000).

WANG, W.; WANG, J. Toll-Like Receptor 4 (TLR4)/Cyclooxygenase-2 (COX-2) Regulates Prostate Cancer Cell Proliferation, Migration, and Invasion by NF- $\kappa$ B Activation. *Med Sci Monit.* 2018 Aug 11;24:5588-5597. doi: 10.12659/MSM.906857.

WANG, Y. et al. Tempol alleviates chronic intermittent hypoxia-induced pancreatic injury through repressing inflammation and apoptosis. *Physiol Res.* 2019 Jun 30;68(3):445-455. doi: 10.33549/physiolres.934010.

WEBBER, M M., BELLO, D., QUADER, S. Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications Part 2. Tumorigenic cell lines. *The Prostate*, v. 30, n. 1, p. 58–64, 1 Jan. 1997.

WEI, Y. et al. Oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction contributes to angiotensin II-induced nonalcoholic fatty liver disease in transgenic Ren2 rats. *Am J Pathol*, v.174, pp. 1329-37, 2009.

WEIL, R.; WHITESIDE, ST.; ISRAEL, A. Control of NF-KB Activity by the I $\kappa$ Bp Inhibitor. *Immunobiol.*, vol. 198, pp. 14-23 (1997).

WILCOX, C. S. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacology and Therapeutics*, v.126, n.2, p.119–145, 2010.

WILCOX, CS; PEARLMAN, A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharm Rev*, 60 (2008), pp. 418-469.

XIAOLI et al., Screening of Target Genes and Regulatory Function of miRNAs as Prognostic Indicators for Prostate Cancer. *Med Sci Monit*, 2015; 21: 3748-3759.

YE, S. et al. The heterocyclic compound Tempol inhibits the growth of cancer cells by interfering with glutamine metabolism. *Cell Death & Disease* volume 11, Article number: 312 (2020).

ZHANG, Q. Interleukin-17 promotes formation and growth of prostate adenocarcinoma in mouse models. *Cancer Res.* 2012 May 15;72(10):2589-99. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3795. Epub 2012 Mar 28.

ZHOU, J. ET AL. OT-674 suppresses photooxidative processes initiated by an RPE lipofuscin fluorophore. *Photochem Photobiol*, 84 (2008), pp. 75-80.

ZHU, L. et al. Association of TLR2 and TLR4 polymorphisms with risk of cancer: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013 Dec 20;8(12):e82858. doi: 10.1371/journal.pone.0082858. eCollection 2013.



## ANEXOS



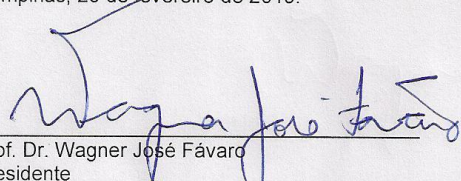
## CERTIFICADO


Certificamos que a proposta intitulada **Microambiente do adenocarcinoma de próstata: Efeito in vivo e in vitro do Tempol sobre marcadores de inflamação, estresse oxidativo, proliferação e expressão de miRNAs**, registrada com o nº **5115-1/2019**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete** e **Isabela Maria Urra Rossetto**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **14 de fevereiro de 2019**.

Finalidade:	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/02/2019 - 01/02/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	25/02/2019 - 01/02/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / C57BL/6/Tg(TRAMP)8247Ng/J
No. de animais:	60
Idade/Peso:	12 semanas / 25 g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / C57BL/6/Tg(TRAMP)8247Ng/J
No. de animais:	60
Idade/Peso:	20 semanas / 28 g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Anatomia, Área de Anatomia, DBEF, IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 25 de fevereiro de 2019.

  
Prof. Dr. Wagner José Fávares  
Presidente

  
Rosangela dos Santos  
Secretária Executiva

**IMPORTANTE:** Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.



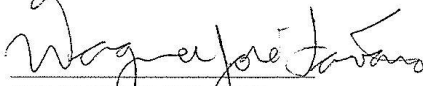
**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada **Microambiente do adenocarcinoma de próstata: Efeito in vivo e in vitro do Tempol sobre marcadores de inflamação, estresse oxidativo, proliferação e expressão de miRNAs**, registrada com o nº **5115-1(A)/2020**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete e Isabela Maria Urra Rossetto**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **21/05/2020**.

<b>Finalidade:</b>	<b>( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica</b>
<b>Vigência do projeto:</b>	15/06/2020 a 01/02/2022
<b>Vigência da autorização para manipulação animal:</b>	21/05/2020 a 01/02/2022
<b>Espécie / linhagem/ raça:</b>	Camundongo transgênico / C57BL/6/Tg(TRAMP)8247Ng/J
<b>No. de animais:</b>	3
<b>Idade/Peso:</b>	12.00 Semanas / 25.00 Gramas
<b>Sexo:</b>	3 Machos
<b>Espécie / linhagem/ raça:</b>	Camundongo transgênico / C57BL/6/Tg(TRAMP)8247Ng/J
<b>No. de animais:</b>	3
<b>Idade/Peso:</b>	12.00 Semanas / 25.00 Gramas
<b>Sexo:</b>	3 Machos
<b>Espécie / linhagem/ raça:</b>	Camundongo transgênico / C57BL/6/Tg(TRAMP)8247Ng/J
<b>No. de animais:</b>	3
<b>Idade/Peso:</b>	20.00 Semanas / 28.00 Gramas
<b>Sexo:</b>	3 Machos
<b>Espécie / linhagem/ raça:</b>	Camundongo transgênico / C57BL/6/Tg(TRAMP)8247Ng/J
<b>No. de animais:</b>	3
<b>Idade/Peso:</b>	20.00 Semanas / 28.00 Gramas
<b>Sexo:</b>	3 Machos
<b>Espécie / linhagem/ raça:</b>	Camundongo transgênico / C57BL/6/Tg(TRAMP)8247Ng/J
<b>No. de animais:</b>	24
<b>Idade/Peso:</b>	20.00 Semanas / 28.00 Gramas
<b>Sexo:</b>	24 Machos
<b>Origem:</b>	CEMIB
<b>Biotério onde serão mantidos os animais:</b>	Biotério da Anatomia, Área de Anatomia, DBEF, IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 06 de julho de 2020.

  
 Prof. Dr. Wagner José Favaro  
 Presidente

  
 Rosângela dos Santos  
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Comissão de Ética no Uso de Animais



CEUA/UNICAMP

---

Certificamos que **ISABELA MARIA URRAS ROSSETTO** concluiu o curso online **Legislação e procedimentos para utilização de animais de laboratório**, oferecido pelo **Instituto de Biologia da UNICAMP** e pela **Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório - CEUA/UNICAMP**.

Este certificado tem validade de 02 (dois) anos a partir da data de emissão.

Campinas, 01 junho 2020.

A handwritten signature in blue ink that reads "Wagner José Fávaro".

Prof. Dr. Wagner José Fávaro  
Professor Assistente Doutor  
Presidente da CEUA/UNICAMP

## 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 **MICROAMBIENTE DO ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA: EFEITO IN VIVO E IN VITRO DO TEMPOL SOBRE MARCADORES DE INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO, PROLIFERAÇÃO E EXPRESSÃO DE MIRNAS**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 22 de setembro de 2023

Assinatura :  \_\_\_\_\_

Nome do(a) autor(a): **Isabela Maria Urra Rossetto**

RG n.º 40575297-0

Assinatura :  \_\_\_\_\_

Nome do(a) orientador(a): **Valéria Helena Alves Cagnon Quitete**

RG n.º 1679306-9