

**FABIO MONTICO**

**"ESTROMA REATIVO E PRÓSTATA:  
SENESCÊNCIA E INIBIÇÃO DA ANGIOGÊNESE x  
LESÕES GLANDULARES NO MODELO TRAMP"**

**"REACTIVE STROMA AND PROSTATE:  
SENESCENCE AND ANGIOGENESIS INHIBITION x  
GLANDULAR LESIONS IN THE TRAMP MODEL"**

**Campinas, 2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**FABIO MONTICO**

**"Estroma reativo e próstata: senescência e inibição da  
angiogênese x lesões glandulares no modelo TRAMP"**

Orientadora: Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

**"Reactive stroma and prostate:  
senescence and angiogenesis inhibition x glandular  
lesions in the TRAMP model"**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural, na área de Anatomia.

*Doctorate thesis presented to the State University of Campinas in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor on Cellular and Structural Biology Postgraduate Programme, in the Biology Institute, in the area of Anatomy.*

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno *Fabio Montico* e orientado pela Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete.

  
Assinatura da Orientadora

**Campinas, 2014**

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

M767e Montico, Fabio, 1987-  
Estroma reativo e próstata : senescência e inibição da angiogênese x lesões glandulares no modelo TRAMP / Fabio Montico. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Próstata. 2. Adenocarcinoma. 3. Envelhecimento. 4. Células estromais. 5. Inibidores da angiogênese. I. Cagnon, Valéria Helena Alves, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Reactive stroma and prostate : senescence and angiogenesis inhibition x glandular lesions in the TRAMP model

**Palavras-chave em inglês:**

Prostate

Adenocarcinoma

Aging

Stromal cells

Angiogenesis inhibitors

**Área de concentração:** Anatomia

**Titulação:** Doutor em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

Valéria Helena Alves Cagnon Quitete [Orientador]

Irene Bastos Franceschini Vicentini

Cleida Aparecida de Oliveira

Maíra Aparecida Stefanini

Sebastião Roberto Taboga

**Data de defesa:** 06-06-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 06 de junho de 2014.

**BANCA EXAMINADORA**

Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete (Orientadora)



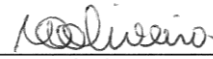
Assinatura

Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini



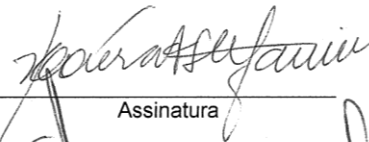
Assinatura

Dra. Cleida Aparecida de Oliveira



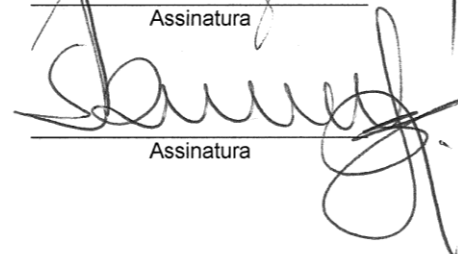
Assinatura

Dra. Maira Aparecida Stefanini



Assinatura

Dr. Sebastião Roberto Taboga



Assinatura

Dr. Luís Antônio Violin Dias Pereira

\_\_\_\_\_

Assinatura

Dra. Maria José Salete Viotto

\_\_\_\_\_

Assinatura

Dra. Maria Júlia Marques

\_\_\_\_\_

Assinatura



## RESUMO

A senescência está associada a modificações hormonais na próstata, resultando em microambiente favorável ao desenvolvimento de lesões neoplásicas. A angiogênese é fundamental para o crescimento tumoral e, na próstata, está sujeita à regulação por andrógenos, sendo sua estimulação um importante evento no estroma reativo associado ao câncer. Assim, a inibição da angiogênese representa terapia promissora no tratamento de neoplasias da próstata. O objetivo deste estudo foi caracterizar aspectos do estroma prostático na senescência e frente a terapias antiangiogênicas e de ablação hormonal, comparando-os com a reação estromal associada a lesões glandulares no modelo TRAMP. Camundongos FVB machos senis (52 semanas) foram submetidos a tratamentos antiangiogênicos com SU5416 (6 mg/kg; i.p.) e/ou TNP-470 (15 mg/kg; s.c.). O bloqueio hormonal foi obtido com finasterida (20 mg/kg; s.c.), isoladamente ou associada a ambos os inibidores. Após 21 dias de tratamento, amostras da próstata dorsolateral foram coletadas para análises morfológicas, imunohistoquímicas e de Western Blotting. A senescência levou à ocorrência de inflamação e de lesões proliferativas na próstata, bem como à maior frequência de células positivas para CD34/VIM e CD34/ $\alpha$ SMA e ao aumento de MMP-9, IGFR-1, VEGF, HIF-1 $\alpha$ , FGF-2, CD31, VIM e  $\alpha$ SMA, caracterizando semelhança com o microambiente prostático de camundongos TRAMP. Por outro lado, a endostatina e o TGF- $\beta$  apresentaram-se elevados somente na senescência, mas não ao longo da progressão tumoral no modelo TRAMP. O tratamento com inibidores angiogênicos levou à recuperação e/ou interrupção das alterações glandulares associadas à senescência, mas efeitos diferenciais foram registrados para as drogas. Enquanto o SU5416 atuou principalmente sobre a remodelação tecidual prostática, reduzindo os níveis de MMP-9, VIM e  $\alpha$ SMA bem como a frequência de células positivas para CD34/VIM e CD34/ $\alpha$ SMA, o TNP-470 influenciou sobretudo o IGFR-1, o VEGF e o HIF-1 $\alpha$ , promovendo inibição de maior amplitude sobre esses fatores. A associação destes inibidores levou à combinação de tais efeitos diferenciais. A finasterida, isoladamente ou associada aos agentes antiangiogênicos, resultou em diminuição dos níveis de MMP-9, IGFR-1, VEGF, HIF-1 $\alpha$  e FGF-2 em relação aos controles, embora tenha demonstrado tendência em regular positivamente a expressão de fatores pró-angiogênicos. Todavia, ao contrário da inibição da angiogênese, a ablação hormonal não resultou em diminuição do TGF- $\beta$ . Assim, concluiu-se que a senescência gerou um microambiente de estroma reativo similar ao do modelo TRAMP, com estímulo aos à proliferação celular, remodelação tecidual, angiogênese e transição

endotélio-mesenquimal, certamente propiciando condições favoráveis para o desenvolvimento de lesões prostáticas pré-malignas e malignas. Entretanto, a ausência de adenocarcinoma pouco diferenciado e a menor distribuição das lesões neoplásicas em relação a camundongos TRAMP sugeriram um possível papel protetor da endostatina sobre a próstata na senescência. A terapia antiangiogênica foi eficaz em promover efeitos antitumorais e a inibição da neovascularização, sobretudo frente à combinação dos inibidores, sugerindo que a ação diferencial desses agentes nos processos tumorigênicos resulta em espectro de ação mais amplo para o tratamento. Por fim, ressalta-se que os efeitos benéficos do tratamento com finasterida merecem especial atenção, considerando o potencial desta droga em promover o estroma reativo facilitador do desenvolvimento de desordens glandulares.



## ABSTRACT

Senescence is associated with hormonal changes in the prostate, leading to a permissive microenvironment for the development of neoplastic lesions. Prostatic angiogenesis is an androgen-regulated process which is fundamental for tumor growth and represents an important event in cancer-associated reactive stroma. Thus, angiogenesis inhibition emerges as a promising therapy in the treatment of prostate neoplasms. The aim herewith was to characterize prostatic stroma during senescence and following antiangiogenic and hormonal ablation therapies, comparing the findings with the reactive stroma phenotype associated to TRAMP model glandular lesions. Elderly male FVB mice (52 week-old) were submitted to antiangiogenic treatments with SU5416 (6 mg/kg; i.p.) and/or TNP-470 (15 mg/kg; s.c.). Hormonal blockage was achieved with finasteride administration (20mg/kg; s.c.), either alone or combined to both inhibitors. After 21 days of treatment, dorsolateral prostate samples were collected for morphological, immunohistochemical and Western Blotting analysis. Senescence led to the occurrence of inflammatory foci and proliferative lesions in the prostate, apart from increased frequency of CD34/VIM and CD34/ $\alpha$ SMA positive cells and raised levels of MMP-9, IGFR-1, VEGF, HIF-1 $\alpha$ , FGF-2, CD31, VIM and  $\alpha$ SMA, resembling TRAMP mice prostatic microenvironment. On the other hand, endostatin and TGF- $\beta$  showed higher expression in senescence but not during tumor progression in the TRAMP model. Antiangiogenic treatment resulted in recovery and/or interruption of the senescence-associated glandular changes, showing differential effects for each drug. SU5416 acted mainly on prostatic tissue remodeling, reducing MMP-9, VIM and  $\alpha$ SMA levels as well as the frequency of CD34/VIM and CD34/ $\alpha$ SMA positive cells, whereas TNP-470 influenced specially IGFR-1, VEGF and HIF-1 $\alpha$ , promoting greater inhibition over these factors. The association between the inhibitors led to synergistic differential effects. Despite presenting a trend to regulate positively pro-angiogenic factor expression, finasteride resulted in decreased MMP-9, IGFR-1, VEGF, HIF-1 $\alpha$  and FGF-2 levels relatively to controls, either in isolation or combined to antiangiogenic agents. However, unlike angiogenesis inhibition, hormonal ablation did not lead to decreased TGF- $\beta$  expression. Thus, it was concluded that senescence created a reactive stroma microenvironment which resembles that verified in the TRAMP model and is characterized by stimulated cell proliferation, tissue remodeling, angiogenesis and endothelial-to-mesenchymal transition. This scenario certainly provided favorable conditions for the development of pre-malignant and malignant prostatic lesions. However, the absence of poor-differentiated adenocarcinoma and the lesser distribution of

neoplastic lesions in relation to TRAMP mice suggested a possible protective role of endostatin on the prostate during aging. Antiangiogenic therapy was efficient in promoting antitumor effects and neovascularization inhibition, especially following the combination of inhibitors, suggesting that the differential action of these agents on tumorigenic processes results in a broader spectrum of effects for the treatment. Finally, it is noteworthy that beneficial effects from finasteride treatment must be looked carefully, considering the capacity of this drug to promote a reactive stroma microenvironment favorable to the development of glandular disorders.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>01</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>4. ARTIGO CIENTÍFICO I</b>	<b>19</b>
<b>5. ARTIGO CIENTÍFICO II</b>	<b>51</b>
<b>6. ARTIGO CIENTÍFICO III</b>	<b>81</b>
<b>7. DISCUSSÃO SUCINTA E PRINCIPAIS CONCLUSÕES</b>	<b>125</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>127</b>
<b>9. ANEXO: CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b>	<b>133</b>



## DEDICATÓRIA

### Aos meus pais, IZILDA e SÍLVIO:

*Há uma canção que diz “ainda somos os mesmos e vivemos como nossos pais”, mas de certa maneira eu discordo disso. Hoje posso dizer que vivo muito melhor do que vocês viveram e, se vivo melhor, sem as mesmas dificuldades pelas quais passaram, é a vocês a quem eu devo toda a minha gratidão. Obrigado por cada esforço que fizeram em meu benefício; obrigado por me proporcionarem todas as oportunidades que nem vocês mesmos, nem muitos ao meu redor, puderam ter; obrigado por confiarem no meu discernimento e apoiarem as minhas decisões, mesmo quando isso significou a ausência e a distância; obrigado por me incentivarem e acreditarem em mim em todas as etapas até aqui. E, acima de tudo, muito obrigado por me ensinarem aquilo que não está nos livros e que nem diploma, nem título nenhum podem ensinar: o doar-se em prol de um filho. Nesse sentido, sim, quero um dia poder dizer que “sou o mesmo e vivo como os meus pais”.*



## **AGRADECIMENTOS**

A **Deus**, por conceder-me fé, sabedoria e tranquilidade para superar os obstáculos do caminho e poder realizar mais esta conquista.

À minha irmã, **Sílvia**, vegetariana e ferrenha defensora dos animais, mas que mesmo assim sabe compreender o bem maior representado pelo meu trabalho. Sempre estarei torcendo por você, apesar das nossas personalidades diametralmente opostas.

À **Raffinha**, pelo companheirismo de tantos anos e, agora, de uma forma ainda mais especial. Obrigado pelo carinho, pelo incentivo e sobretudo pela paciência.

À **Professora Valéria**, pela sólida parceria desde os tempos da iniciação científica, da qual sempre colhemos ótimos frutos. Obrigado por todos os ensinamentos, todo o conhecimento adquirido e por me tornar o profissional que sou hoje. Mais do que isso, obrigado pela confiança depositada, pela leveza e descontração com que conduz a nossa equipe e pela amizade construída ao longo destes sete anos de convívio. E “vamo que vamo” professora!

Aos **Professores Dra. Cíntia Yuri Matsumura, Dr. Gustavo Ferreira Simões e Dra. Elaine Minatel**, pela participação e por suas pertinentes sugestões no exame de qualificação.

Aos **Professores Dra. Cleida Aparecida de Oliveira, Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini, Dr. Luís Antônio Violin Dias Pereira, Dra. Maíra Aparecida Stefanini, Dra. Maria José Salete Viotto, Dra. Maria Júlia Marques e Dr. Sebastião Roberto Taboga** pelo aceite do convite para composição da banca examinadora da defesa e pelas certamente valiosas contribuições para a redação final desta tese.

Aos **Docentes do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional**, pelo aprendizado compartilhado nas disciplinas, no convívio diário e pela colaboração para minha formação como educador.

Ao **Prof. David Rowley** e à **Rebeca San Martin**, pelo conhecimento compartilhado durante minha temporada em Houston e pela inquestionável contribuição na ampliação dos horizontes deste trabalho.

Ao amigo **Edward Roshan Miranda**, pela ajuda e hospitalidade ao longo dos meus 103 dias de vida texana e por tantas e tantas noites na companhia do sensacional Jack Bauer.

Aos meus amados atuais e ex-membros do **Laboratório de Biologia da Reprodução**, do qual muito me orgulho de fazer parte:

**Amanda (Amandita)**, pelas longas conversas compartilhando preocupações, estórias e risos. Obrigado pelos anos de amizade, apoio e companheirismo!

**Cândido (Cândis)**, pela tranquilidade e leveza com que leva a vida. Obrigado por ser este exemplo enorme de honestidade e bondade!

**Carol (Miss Tietê)**, pelo bom humor com que contagia o laboratório a cada chegada sua. Obrigado por fazer nossos dias mais divertidos!

**Larissa Kido (Cabeçudinha)**, pela parceria imbatível na bancada e na vida. Obrigado pelos conselhos e pelos momentos divertidos ao som da Nova Brasil!

**Mari (Mary Jane)**, pela solicitude e atenção de todos os dias. Obrigado por ser essa pessoa tão gentil e por nos fartar com suas guloseimas!

**Raísa**, pela autenticidade, sinceridade e humor afiado. Obrigado por ser essa pessoa tão especial de quem sentimos falta diariamente!

Às queridas amigas **Karina** e **Larissa Rizzo**, pela amizade inabalável e tão preciosa desde os tempos da Graduação. Vocês são verdadeiros achados nos dias de hoje!

A todos os meus **amigos e familiares**, que mesmo sem entender muito bem esse universo paralelo da Pós-Graduação sempre acompanharam minha trajetória e torceram pelo meu sucesso.

Aos **colegas do curso de Pós-Graduação**, pela amizade, convivência e por transformarem o local de trabalho em um ambiente agradável e prazeroso.



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

À **Lilium Alves Senne**, pela dedicação e competência com que desenvolve seu trabalho e pela atenção dispensada durante toda a Pós-Graduação.

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

À **CAPES/PROEX**, **CAPES/PROAP** e ao **CNPq**, pelo auxílio financeiro, e à **FAPESP**, pela concessão da bolsa de doutorado (2011/01968-3) e dos projetos de auxílio à pesquisa (2010/51112-5 e 2012/03010-4), os quais foram imprescindíveis para o desenvolvimento e finalização desta tese.



*“Você pode ter tudo o que quiser se fizer esforços para ajudar outras pessoas a terem o que elas querem”.*

**(Hilary Hinton “Zig” Ziglar, 1926 – 2012)**



## LISTA DE ABREVIATURAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- AR:** Receptor androgênico
- CAF:** Fibroblasto associado ao câncer
- DHT:** Dihidrotestosterona
- EMT:** Transição epitélio-mesenquimal
- EndMT:** Transição endotélio-mesenquimal
- FAP:** Proteína ativadora de fibroblastos
- FGF:** Fator de crescimento fibroblástico
- FGFR:** Receptor de fator de crescimento fibroblástico
- FSP-1:** Proteína específica de fibroblastos-1
- FVB:** *Friend virus B*
- HBP:** Hiperplasia benigna prostática
- HIF:** Fator indutor de hipóxia
- IGF:** Fator de crescimento homólogo à insulina
- IGFBP:** Proteína ligante de IGF
- IGFR:** Receptor do fator de crescimento homólogo à insulina
- MEC:** Matriz extracelular
- MMP:** Metaloproteinase de matriz
- MMT:** Transição mesênquimo-mesenquimal
- MSC:** Célula-tronco mesenquimal
- MVD:** Densidade de microvasos
- NIP:** Neoplasia intraepitelial prostática
- SASP:** Fenótipo secretor associado à senescência
- SV40:** *Simian virus 40*
- TGF:** Fator de crescimento transformante
- TRAMP:** Camundongo transgênico para o adenocarcinoma de próstata
- VEGF:** Fator de crescimento do endotélio vascular
- VEGFR:** Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular
- VIM:** Vimentina
- $\alpha$ SMA:**  $\alpha$ -actina de músculo liso



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. Próstata: morfologia e fisiologia

A próstata é uma glândula sexual acessória masculina com importante função no processo reprodutivo, secretando diversos nutrientes essenciais para a nutrição e motilidade dos espermatozoides (Marker *et al.*, 2003). Nos roedores, a próstata divide-se em pares de lobos: ventral, dorsal e lateral, considerando a localização ao redor da uretra prostática; além de um lobo anterior ou glândula de coagulação, localizada na face côncava da vesícula seminal (Sugimura *et al.*, 1986; Marker *et al.*, 2003). Os lobos dorsal e lateral frequentemente são considerados em conjunto como um único par dorsolateral, uma vez que seus sistemas de ductos são contínuos através de um istmo (Jesik *et al.*, 1982; Roy-Burman *et al.*, 2004). Este lobo corresponde à região onde tem início a carcinogênese em modelos murinos, além de apresentar maior homologia com a zona periférica da próstata humana, onde o câncer é de ocorrência prevalente (Roy-Burman *et al.*, 2004; Bianchi-Frias *et al.*, 2010).

Do ponto de vista histológico, a próstata é uma glândula túbulo-alveolar composta de ácinos envoltos por estroma e revestidos por epitélio secretor simples, constituído por camadas basal e luminal (Niu & Xia, 2009). O estroma prostático consiste principalmente de células musculares lisas e fibroblastos cuja principal função é sintetizar os componentes regulatórios e estruturais da matriz extracelular (MEC), mas contém também vasos sanguíneos, terminações nervosas e células do sistema imunológico (Tuxhorn *et al.*, 2001; Bianchi-Frias *et al.*, 2010). A MEC é uma rede de proteínas fibrilares, glicoproteínas adesivas e proteoglicanos, sendo também um reservatório de fatores de crescimento ativos e latentes, além de conter numerosas classes de enzimas que regulam a degradação de seus componentes, destacando-se as metaloproteinases de matriz (MMPs) (Tuxhorn *et al.*, 2001; Lynch & Matrisian, 2002; Brennan *et al.*, 2004). Assim, o microambiente estromal contém moléculas com papel estrutural e um espectro de fatores autócrinos e parácrinos, atuando de maneira coordenada na regulação das funções celulares e na manutenção da homeostase tecidual (Tuxhorn *et al.*, 2001; Bianchi-Frias *et al.*, 2010).

Os processos de proliferação e diferenciação celular, secreção e crescimento tumoral na próstata são regulados por polipeptídeos como os fatores de crescimento homólogos à insulina (IGFs), fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs), fatores de crescimento transformantes (TGFs) e fatores de crescimento do endotélio vascular

(VEGFs) (Reynolds & Kyprianou, 2006). Os fatores de crescimento e seus receptores atuam como mediadores da interação bidirecional entre epitélio e estroma, a qual também envolve sinais providos por proteínas da MEC e pelos receptores intracelulares de hormônios esteroides (Chung *et al.*, 2005). A interação epitélio-estroma tem papel primordial na manutenção da estrutura, função e crescimento da próstata, sendo que seu desequilíbrio favorece a formação do carcinoma prostático (Cunha *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2005).

O desenvolvimento, morfologia e fisiologia da próstata são regulados por andrógenos, os quais expressam seus efeitos biológicos através da interação com o receptor androgênico (AR) localizado no meio intracelular (Cunha *et al.*, 2002; Tindall & Rittmaster, 2008). Os principais andrógenos a induzir a diferenciação prostática são a testosterona e a dihidrotestosterona (DHT), a qual resulta da conversão da testosterona por ação da enzima 5 $\alpha$ -redutase tipo II, isoforma predominante nos órgãos genitais masculinos (Thomas *et al.*, 2008b). Embora ambos os hormônios sejam capazes de manter a atividade prostática, a DHT tem maior afinidade pelo AR, sendo cerca de 10 vezes mais potente devido à dissociação mais lenta do receptor e por induzir no mesmo uma conformação mais resistente à degradação (Droller, 1997; Thomas *et al.*, 2008b; Tindall & Rittmaster, 2008). Os andrógenos têm papel significativo na patogênese de doenças prostáticas associadas ao envelhecimento, como a hiperplasia benigna (HBP) e o câncer (Thomas *et al.*, 2008a; Tindall & Rittmaster, 2008). Assim, considerando que a DHT é o principal andrógeno responsável pela regulação do crescimento e sobrevivência do tecido prostático, tanto em condições normais como patológicas, a inibição da 5 $\alpha$ -redutase tipo II por meio da finasterida tem sido adotada na quimioprevenção e no tratamento de lesões prostáticas (Pareek *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2008b).

## **1.2. Senescência, doenças prostáticas e o modelo TRAMP**

A senescência está associada a mudanças hormonais significantes, gerando alterações morfofuncionais no sistema genital masculino de camundongos com idade entre 12 e 24 meses, como declínio da fertilidade, atrofia testicular e redução da espermatogênese (Ryu *et al.*, 2006; Chorilli *et al.*, 2007). Na próstata, tanto em roedores como em homens, ocorre diminuição progressiva da atividade da enzima 5 $\alpha$ -redutase no epitélio glandular, resultando em queda nos níveis epiteliais de DHT (Krieg *et al.*, 1993; Banerjee *et al.*, 1998; Banerjee *et al.*, 2001). Inversamente, há acúmulo progressivo de estradiol no estroma prostático, acentuando os efeitos potencialmente patogênicos dos



estrógenos sobre o órgão ao longo do processo de senescência (Krieg *et al.*, 1993; Banerjee *et al.*, 1998; Banerjee *et al.*, 2001). Nesse sentido, sabe-se que alterações na relação entre os níveis de andrógenos e estrógenos têm sido associadas à emergência de lesões prostáticas benignas e malignas (Ellem & Risbridger, 2010). Assim, em decorrência do desequilíbrio hormonal associado a esse período da vida, diversas alterações morfológicas foram registradas na próstata de roedores, como involução e atipia epiteliais, hipertrofia estromal, hiperplasia de ambos os compartimentos glandulares e infiltração de células inflamatórias (Lau *et al.*, 2003; Bianchi-Frias *et al.*, 2010; Montico *et al.*, 2011). Além disso, sugeriu-se que durante a senescência as células prostáticas desenvolvem independência androgênica, tornando o órgão menos sensível à ablação de andrógenos (Banerjee *et al.*, 2000; Morrissey *et al.*, 2002).

No organismo senil, o microambiente estromal de diferentes órgãos está modificado devido ao acúmulo de fibroblastos senescentes cujo transcriptoma está alterado, resultando no chamado fenótipo secretor associado à senescência (SASP, do inglês: *senescence-associated secretory phenotype*) (Campisi, 2005; Sprenger *et al.*, 2008; Coppé *et al.*, 2010; Davalos *et al.*, 2010). Este fenótipo caracteriza-se pela secreção aumentada de componentes da MEC, proteases, citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, como o VEGF (Krtolica & Campisi, 2002; Campisi, 2005; Sprenger *et al.*, 2008; Coppé *et al.*, 2010). De maneira interessante, nenhum fator angiostático foi apontado como componente do fenótipo SASP, atribuindo-lhe caráter essencialmente pró-angiogênico (Coppé *et al.*, 2010; Davalos *et al.*, 2010). Mais ainda, sugere-se a existência de um mecanismo de amplificação do estímulo à angiogênese, visto que as células inflamatórias e imunes recrutadas pelas células estromais senescentes também secretam fatores pró-angiogênicos (Coppé *et al.*, 2010; Davalos *et al.*, 2010).

Paralelamente, a senescência também está associada ao acúmulo de células epiteliais portando mutações com potencialidade para gerar câncer, sendo o seu crescimento suprimido pelo microambiente adjacente (Campisi, 2005). Entretanto, as alterações estromais geradas pelos fibroblastos senescentes são capazes de atenuar essa supressão, favorecendo a proliferação e progressão dessas células epiteliais pré-neoplásicas em direção à malignidade (Campisi, 2005; Dean & Nelson, 2008; Sprenger *et al.*, 2008; Coppé *et al.*, 2010). Desse modo, fibroblastos senescentes, inclusive os de origem prostática, apresentam fenótipo muito semelhante ao de fibroblastos associados ao câncer (CAFs), secretando fatores capazes de promover a hiperproliferação de células epiteliais, estimular a angiogênese, bem como aumentar a capacidade de invasão de

células transformadas, culminando em um microambiente permissivo à tumorigênese (Olumi *et al.*, 1999; Bavik *et al.*, 2006; Coppé *et al.*, 2006; Davalos *et al.*, 2010). Na próstata, em particular, esta permissividade decorre do fato de o microambiente tecidual do indivíduo senil conter muitos componentes pró-angiogênicos, sobrepujando a diminuição desses fatores em nível corporal (Reed *et al.*, 2007; Sprenger *et al.*, 2008). Assim, a angiogênese está estimulada no órgão durante a senescência, processo que tem sido apontado como favorável à patogênese do câncer de próstata (Reed *et al.*, 2007; Sprenger *et al.*, 2008).

O adenocarcinoma de próstata constitui a segunda maior causa de mortes por câncer entre homens ocidentais, sendo a doença neoplásica mais comum no sexo masculino (Sprenger *et al.*, 2008; Niu & Xia, 2009; Mukherji *et al.*, 2013). No Brasil, estima-se que, somente em 2014, mais de 68 mil novos casos serão diagnosticados (Instituto Nacional do Câncer, 2014). Embora a etiologia da doença não esteja totalmente estabelecida, sabe-se que fatores ambientais e genéticos estão envolvidos, sendo que o envelhecimento do organismo constitui o principal fator de risco nos diferentes grupos étnicos e raciais (Krtolica & Campisi, 2002; Chiaverotti *et al.*, 2008; Dean & Nelson, 2008; Sprenger *et al.*, 2008). Assim, aos 80 anos de idade, cerca de 23% dos homens desenvolvem câncer de próstata, o qual frequentemente estende-se além dos limites normais do órgão (Droller, 1997; Rizzo *et al.*, 2005). A neoplasia intraepitelial prostática (NIP) é considerada uma lesão precursora do adenocarcinoma invasivo, podendo precedê-lo por até 10 anos, mas os mecanismos moleculares envolvidos nessa transição ainda não são conhecidos (Majumder *et al.*, 2008).

Dentre os diversos modelos experimentais desenvolvidos para estudar os eventos moleculares relacionados ao desenvolvimento e progressão do câncer prostático, o camundongo transgênico para o adenocarcinoma de próstata (TRAMP, do inglês: *transgenic adenocarcinoma of mouse prostate*) tem sido amplamente utilizado, uma vez que desenvolve tumores que compartilham muitas características com o câncer humano, incluindo metástases à distância, progressão para a independência androgênica e diferenciação neuroendócrina (Chiaverotti *et al.*, 2008). O camundongo TRAMP expressa oncoproteínas virais SV40 nas células luminiais prostáticas sob o controle do promotor andrógeno-responsivo do gene probasina de rato, bloqueando assim a atividade de importantes genes supressores de tumor (Greenberg *et al.*, 1995; Gingrich *et al.*, 1999). Durante seu tempo de vida, esses animais desenvolvem formas progressivas do câncer de próstata, sendo que lesões NIP apresentam-se entre 6 e 12 semanas de idade, ao

passo que tumores primários e metastáticos são observados em todos os animais entre 18 e 24 semanas, sobretudo no lobo dorsolateral da próstata (Greenberg *et al.*, 1995; Gingrich *et al.*, 1999). A partir de 30 semanas, ocorrem metástases para linfonodos e/ou pulmões bem como invasão das vesículas seminais, sendo que a sobrevivência dos animais varia de 50 à 54 semanas de idade (Greenberg *et al.*, 1995; Chiaverotti *et al.*, 2008). O modelo TRAMP foi originalmente produzido e caracterizado a partir da linhagem de camundongos C57BL/6 (B6), contudo foi demonstrado posteriormente que os tumores surgiam mais rapidamente e apresentavam-se mais vascularizados em camundongos [TRAMP C57BL/6 X FVB] F<sub>1</sub>, possivelmente em decorrência de uma ativação precoce da angiogênese nesses camundongos (Gingrich *et al.*, 1999).

### **1.3. Estroma reativo**

Os tumores são estruturas complexas e desorganizadas, as quais contêm, além das células tumorais, diversos elementos estromais, como MEC, fibroblastos, células endoteliais e imunes (Tuxhorn *et al.*, 2001; Zeisberg *et al.*, 2007a). De fato, em alguns carcinomas, mais de 90% do tumor é constituído por estroma, sendo conhecido que o estroma tumoral é fundamentalmente diferente do estroma no tecido normal (Elenbaas & Weinberg, 2001; Tuxhorn *et al.*, 2001; Zeisberg *et al.*, 2007a). Evidências sugerem que o crescimento inicial dos diferentes tipos de carcinoma, inclusive o adenocarcinoma prostático, é dependente de interações parácrinas com células do estroma, ativando diversas vias e fatores estromais que exercem influências indutivas sobre as células tumorais, como alterações genéticas e fenotípicas que lhes garantem maior capacidade de proliferação e sobrevivência (Rowley, 1999; Tuxhorn *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2005; Verona *et al.*, 2007). Portanto, a simples ocorrência de mutações não é suficiente para desencadear a gênese do tumor, sendo necessário um microambiente permissivo no qual as células transformadas possam progredir para um fenótipo maligno (Sprenger *et al.*, 2008).

O termo estroma reativo tem sido utilizado em diversas neoplasias para descrever as alterações fenotípicas e genotípicas que ocorrem nas células estromais em resposta ao carcinoma epitelial (Rowley *et al.*, 1999; Tuxhorn *et al.*, 2001; Barron & Rowley, 2012). O estroma é responsável pelo reparo tecidual mediante injúrias e a invasão do câncer através da membrana basal pode ser considerada um desequilíbrio na homeostase do tecido (Tuxhorn *et al.*, 2001). Assim, a reação estromal assemelha-se em muitos aspectos a uma resposta de reparo tecidual, caracterizada por proliferação das células do estroma,

remodelação da MEC, aumento da atividade proteolítica e da biodisponibilidade de fatores de crescimento, influxo de células inflamatórias e indução de angiogênese (Rowley *et al.*, 1999; Tuxhorn *et al.*, 2001). Considerando que a remodelação do compartimento estromal na cicatrização cria um microambiente promotor do crescimento tecidual, sugere-se que a existência de eventos similares no estroma reativo adjacente ao câncer acelere a progressão tumoral, sobretudo nos estágios iniciais da carcinogênese (Tuxhorn *et al.*, 2002a; Tuxhorn *et al.*, 2002b). Diferentes autores sugeriram que a ocorrência e a intensidade das modificações estromais podem ser úteis como indicadores prognósticos da progressão e recorrência do carcinoma prostático, apontando o ambiente de estroma reativo como um importante componente biológico do câncer (Tuxhorn *et al.*, 2001; Ayala *et al.*, 2003; Tomas *et al.*, 2010).

O estroma reativo no câncer de próstata caracteriza-se por significativa redução das células musculares lisas predominantes no estroma normal e por simultâneo aumento na quantidade de CAFs e miofibroblastos (Rowley, 1999; Tuxhorn *et al.*, 2002b; Barron & Rowley, 2012). Os miofibroblastos são células com fenótipo intermediário entre fibroblastos e células musculares lisas, tendo em vista a expressão de proteínas do citoesqueleto e aspectos ultraestruturais (Tuxhorn *et al.*, 2001; Tuxhorn *et al.*, 2002b; Tomas *et al.*, 2010). Normalmente presente nas respostas de reparo tecidual, este tipo celular possivelmente origina-se a partir da diferenciação de fibroblastos quiescentes, processo caracterizado pela expressão *de novo* de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA), formação de filamentos contráteis e maior desenvolvimento das organelas celulares de síntese (Tuxhorn *et al.*, 2001; Cirri & Chiarugi, 2011). Posteriormente, estas células também foram identificadas como o principal tipo celular estromal em uma variedade de condições patológicas, como doenças fibróticas e na reação estromal em resposta a diversos tipos de adenocarcinoma (Tuxhorn *et al.*, 2001; Barron & Rowley, 2012). Marcadores mesenquimais como vimentina (VIM),  $\alpha$ SMA, tenascina-C, proteína ativadora de fibroblastos (FAP) e pró-colágeno tipo I são expressos em miofibroblastos logo nos primeiros estágios de formação do estroma reativo associado ao carcinoma prostático (Cirri & Chiarugi, 2011; Barron & Rowley, 2012). Além disso, sabe-se que ocorre aumento na proporção deste tipo celular conforme a doença progride para estágios mais avançados (Tuxhorn *et al.*, 2002b). Embora os mecanismos indutivos envolvidos no desenvolvimento do estroma reativo ainda permaneçam obscuros, acredita-se que os miofibroblastos no estroma de tumores prostáticos tenham origem a partir da ativação de um anel periacinar de fibroblastos por células de uma NIP adjacente e que o TGF- $\beta$  esteja

envolvido nesse processo, tendo em vista sua expressão aumentada nas células epiteliais pré-malignas (Tuxhorn *et al.*, 2002b). De fato, o TGF- $\beta$  é um mediador crucial da resposta estromal durante o reparo tecidual e diversos estudos demonstraram sua capacidade de induzir a diferenciação fenotípica de fibroblastos em miofibroblastos tanto *in vitro* como *in vivo* (Roberts *et al.*, 1986; Desmoulière *et al.*, 1993; Tuxhorn *et al.*, 2002b).

A modificação fenotípica dos fibroblastos situados no estroma adjacente a células epiteliais transformadas já foi documentada em diversos sistemas experimentais (Olumi *et al.*, 1999; Hayward *et al.*, 2001; Tuxhorn *et al.*, 2002b). Nos últimos anos, os CAFs têm recebido crescente atenção em decorrência da sua participação no desenvolvimento e progressão de tumores, incluindo os processos de invasão e metástases, bem como em razão da possibilidade de sua utilização como marcadores prognósticos em pacientes (Ayala *et al.*, 2003; Cirri & Chiarugi, 2011). Ainda se discute se os CAFs e os miofibroblastos representam diferentes populações celulares ou se correspondem ao mesmo tipo celular com diferentes perfis de expressão gênica (Barron & Rowley, 2012; San Martin *et al.*, 2014). Entretanto, é amplamente conhecido que ambos representam células estromais ativadas em resposta ao carcinoma epitelial que, em oposição ao papel dos fibroblastos na manutenção da homeostase tecidual na ausência de injúrias, provêm sinais biológicos que favorecem a progressão tumoral em decorrência da geração de um microambiente de reparo tecidual crônico (Barron & Rowley, 2012). Assim, estabelece-se um intercâmbio recíproco de sinais entre o câncer e as células estromais, no qual podem ser distinguidas duas vias: na via eferente, as células tumorais induzem uma resposta reativa do estroma e; na via aferente, as células estromais modificadas do microambiente circundante afetam as respostas das células neoplásicas por meio da produção de proteases, componentes da MEC, citocinas e fatores de crescimento que favorecem a progressão tumoral (Tuxhorn *et al.*, 2001; Cirri & Chiarugi, 2011).

A origem dos CAFs e miofibroblastos presentes no estroma reativo ainda é assunto não esclarecido e tem sido alvo de muitos estudos (Barron & Rowley, 2012). Acredita-se que estas células tenham origem múltipla, a qual pode variar de acordo com o tipo de tumor bem como entre diferentes regiões de tumores individuais (Cirri & Chiarugi, 2011; Barron & Rowley, 2012). Em uma das hipóteses aventadas, acredita-se que estes tipos celulares possam surgir a partir da ativação de células residentes no tecido, como fibroblastos quiescentes, pericitos e células musculares lisas associados aos vasos, adipócitos, células inflamatórias, além de células mesenquimais tronco/progenitoras, em um processo denominado transição mesênquimo-mesenquimal (MMT) (Kalluri & Zeisberg,

2006; Cirri & Chiarugi, 2011; Barron & Rowley, 2012; Zhang & Liu, 2013). Segundo outra linha de evidências, os tipos celulares precursores dos CAFs/miofibroblastos seriam células-tronco mesenquimais (MSCs) circulantes derivadas da medula óssea (Kalluri & Zeisberg, 2006; Cirri & Chiarugi, 2011; Barron & Rowley, 2012). Uma terceira origem proposta é a partir de células epiteliais normais ou cancerosas através de um processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT), por meio do qual estas células tornam-se CAFs/miofibroblastos e adquirem características mesenquimais, como elevada capacidade migratória e invasiva (Cirri & Chiarugi, 2011; Barron & Rowley, 2012; Zhang & Liu, 2013). Por fim, células endoteliais em proliferação também podem originar CAFs através de um processo chamado transição endotélio-mesenquimal (EndMT) (Zeisberg *et al.*, 2007a; Cirri & Chiarugi, 2011; Zhang & Liu, 2013).

A ocorrência de EndMT foi primeiramente observada em estudos acerca do desenvolvimento embrionário do coração, mas evidências recentes demonstraram que este processo pode ocorrer também em diversos cenários patológicos, incluindo fibrose cardíaca e câncer (Markwald *et al.*, 1975; Markwald *et al.*, 1977; Zeisberg *et al.*, 2007a, Zeisberg *et al.*, 2007b). A EndMT consiste em uma forma de plasticidade endotelial na qual células endoteliais residentes destacam-se de uma camada celular organizada no interior dos vasos e migram para o tecido subjacente (Potenta *et al.*, 2008). Durante este processo, ocorre perda das junções celulares e da polaridade ápico-basal dessas células, as quais adquirem fenótipo mesenquimal, caracterizado por formato fusiforme e aquisição de propriedades invasivas e migratórias (Potenta *et al.*, 2008; Medici *et al.*, 2011; Medici & Kalluri, 2012). Além disso, há drástica redução da expressão de marcadores endoteliais, como CD31, e ganho de marcadores mesenquimais, como a proteína específica de fibroblastos-1 (FSP-1), a VIM e a  $\alpha$ SMA (Potenta *et al.*, 2008; Medici & Kalluri, 2012). A EndMT provavelmente inicia-se em resposta a sinais inflamatórios autócrinos e/ou parácrinos provenientes do tecido circundante, como o TGF- $\beta$ , ou, alternativamente, em resposta a uma injúria vascular (Potenta *et al.*, 2008). Assim, o TGF- $\beta$  emerge como um importante mediador do processo e da ativação de CAFs e miofibroblastos na formação do estroma reativo, sendo que muitos tipos celulares endoteliais demonstraram ocorrência de EndMT quando expostos a esta molécula *in vitro* (Zeisberg *et al.*, 2007a, Zeisberg *et al.*, 2007b; Medici *et al.*, 2010; Medici *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2012).

O TGF- $\beta$  é uma citocina multifuncional que pode atuar tanto como estimulador quanto como inibidor do crescimento celular, dependendo do tipo de célula e de seu estágio de diferenciação (Soulitzis *et al.*, 2006). De maneira geral, suas funções estão

relacionadas à inibição do crescimento epitelial e regulação da diferenciação e migração celulares (Wikström *et al.*, 1998; Verona *et al.*, 2007; Niu & Xia, 2009). Entretanto, em casos de neoplasia, as células tumorais exploram as diversas atividades biológicas dessa molécula para promover o desenvolvimento tumoral e de metástases (Wikström *et al.*, 1998; Soultzis *et al.*, 2006; Niu & Xia, 2009). Assim, a expressão do TGF- $\beta$  é maior nos tumores de próstata do que no tecido normal, estimulando a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (Tuxhorn *et al.*, 2002b). Em contrapartida, estes produzem fatores de crescimento como o IGF-1 e proteases como as MMPs, que favorecem a progressão tumoral, promovendo a remodelação da MEC, proliferação, migração e sobrevivência celulares, além da atração de células inflamatórias e indução da angiogênese (Tuxhorn *et al.*, 2001; Tuxhorn *et al.*, 2002a; Cirri & Chiarugi, 2011).

As MMPs são produzidas por uma variedade de tecidos e compreendem uma família mude enzimas proteolíticas coletivamente capazes de degradar todos os componentes da MEC, atuando também sobre proteínas de membrana, na ativação de outras MMPs, bem como na clivagem de fatores de crescimento, reguladores da migração celular e angiogênicos (Lynch & Matrisian, 2002; London *et al.*, 2003; Brennan *et al.*, 2004). Assim, desempenham importante papel na regulação de várias funções celulares e principalmente na remodelação tecidual, tanto em situações fisiológicas, como a cicatrização, quanto patológicas, como invasão e metástases tumorais (Tuxhorn *et al.*, 2001; London *et al.*, 2003). Os tumores de próstata em particular expressam níveis crescentes das MMPs 2 e 9, as quais degradam a membrana basal (Sprenger *et al.*, 2008).

O IGF-1 atua como mitógeno em uma variedade de células e exerce sua ação aumentando a síntese de DNA, acelerando a progressão do ciclo celular e bloqueando a via apoptótica (Djavan *et al.*, 2001; Gennigens *et al.*, 2006). Na próstata, o IGF-1 é produzido pelas células estromais e atua como fator de crescimento parácrino no epitélio normal, sendo suas ações mediadas pelo receptor IGFR-1, o qual é expresso tanto em células epiteliais como no estroma prostático (Djavan *et al.*, 2001; Gennigens *et al.*, 2006; Niu & Xia, 2009). Os IGFs circulantes no soro e nos fluidos extracelulares encontram-se ligados com grande afinidade a proteínas específicas, as proteínas ligantes de IGF (IGFBPs), as quais regulam os efeitos metabólicos e mitogênicos dos IGFs, modulando sua interação com o IGFR-1 na superfície celular (Mañes *et al.*, 1999; Pollak *et al.*, 2004; Gennigens *et al.*, 2006). A elevação dos níveis de IGF-1, bem como da atividade e expressão de seu receptor, têm sido relacionados à proliferação celular aumentada e

redução da apoptose, podendo eventualmente resultar em transformação maligna em muitos órgãos, incluindo a próstata (Gennigens *et al.*, 2006).

#### **1.4. Angiogênese: regulação e inibição**

A angiogênese é definida como o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes e possui papel importante no crescimento, desenvolvimento, cicatrização e tumorigênese (van Moorselaar & Voest, 2002). Trata-se de um processo complexo de múltiplas etapas envolvendo interações entre células endoteliais, MEC e fatores solúveis (van Moorselaar & Voest, 2002). De maneira geral, todas as etapas são reguladas pelo balanço relativo entre indutores e inibidores no microambiente tumoral, os quais podem ser secretados pelas células tumorais ou estromais, ou então mobilizados a partir da MEC (Tuxhorn *et al.*, 2001; van Moorselaar & Voest, 2002). No câncer, visando atender suas necessidades metabólicas, os tumores malignos induzem sua própria neovascularização, recrutando células endoteliais de microvasos no estroma adjacente e estimulando a proliferação das mesmas para formar novos vasos sanguíneos (Tuxhorn *et al.*, 2001; Condon *et al.*, 2005). Durante esse processo, ocorre modificação nos níveis de secreção dos mediadores angiogênicos, com diminuição dos níveis de inibidores, acréscimo dos indutores ou ainda uma combinação desses eventos no meio extracelular (Doll *et al.*, 2001). Assim, a angiogênese é um processo cuja ocorrência e regulação estão associadas ao compartimento estromal, demonstrando a importância das interações entre células tumorais e estromais durante a progressão do câncer prostático (Tuxhorn *et al.*, 2001; Condon *et al.*, 2005).

Marcadores de células endoteliais, como o antígeno de superfície CD31, têm sido utilizados como importante ferramenta na determinação da densidade de microvasos (MVD) associados a tumores, permitindo a caracterização histopatológica de lesões neoplásicas em diferentes tecidos (Hanahan & Folkman, 1996; van Moorselaar & Voest, 2002). Na próstata, a MVD apresentou-se aumentada em áreas de câncer em relação ao tecido normal adjacente (Strohmeier *et al.*, 2000). Em concordância, Huss *et al.* (2001) verificaram em camundongos TRAMP que a ativação da angiogênese é um evento discreto durante os estágios iniciais do desenvolvimento tumoral, precedendo o aparecimento de tumores palpáveis. Nesse sentido, Tuxhorn *et al.* (2002a) sugeriram que células estromais ativadas pela transformação epitelial propiciam sinais angiogênicos durante os estágios iniciais da carcinogênese prostática, aumentando a incidência e a taxa de crescimento tumoral. Posteriormente, estes autores demonstraram que a inibição



da atividade do TGF- $\beta$  levou à redução da vascularização e da massa tumoral no câncer de próstata com estroma reativo, sugerindo a angiogênese mediada pelo TGF- $\beta$  como importante mecanismo através do qual o estroma promove o crescimento inicial de tumores prostáticos (Tuxhorn *et al.*, 2002c). De fato, sabe-se que o TGF- $\beta$  pode promover a angiogênese tanto por sua atuação direta sobre as células endoteliais quanto indiretamente, agindo nas células estromais e induzindo a secreção de fatores promotores da proliferação, migração e formação de tubos endoteliais, como por exemplo, o VEGF e o FGF-2 (Wikström *et al.*, 1998; Tuxhorn *et al.*, 2001; Tuxhorn *et al.*, 2002c).

O VEGF é o mais potente mediador da formação de novos vasos sanguíneos e das funções de células endoteliais, atuando como mitógeno sobre essas células, estimulando sua migração e protegendo-as da apoptose, além de aumentar a permeabilidade do endotélio vascular (van Moorselaar & Voest, 2002). A transdução dos sinais do VEGF ocorre por meio de dois tipos de receptores quinase de tirosina localizados na membrana das células endoteliais, VEGFR1 e VEGFR2, sendo este o principal mediador de suas ações (van Moorselaar & Voest, 2002; Reynolds & Kyprianou, 2006). Enquanto na próstata normal foram verificados baixos níveis de VEGF, em condições patológicas, como na HBP, na NIP de alto grau e no câncer, observou-se aumento de sua reatividade, tanto nas células tumorais como no estroma (Mazzucchelli *et al.*, 2000; Doll *et al.*, 2001). A secreção de VEGF é induzida pelo fator indutor de hipóxia-1 (HIF-1), um fator de transcrição que consiste de um heterodímero formado pelas subunidades HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$ , produzido pelas células em resposta a baixas pressões de oxigênio (Huss *et al.*, 2001; van Moorselaar & Voest, 2002; Berger *et al.*, 2003; Kimbro & Simons, 2006). Em condições de hipóxia, o HIF-1 $\alpha$  é estabilizado e protegido da degradação, sendo translocado para o núcleo da célula, onde se dimeriza com a subunidade HIF-1 $\beta$  e ativa a expressão de inúmeros genes de resposta à hipóxia, dentre eles fatores angiogênicos como VEGF, TGF- $\beta$  e o FGF-2 (Huss *et al.*, 2001; Berger *et al.*, 2003; Macpherson *et al.*, 2003; Kimbro & Simons, 2006; Mabeesh & Amir, 2007). Ainda, diversos estudos demonstraram que a expressão de VEGF na próstata está sujeita à regulação por andrógenos (Joseph *et al.*, 1997; Häggström *et al.*, 1999).

O FGF-2 também é um importante regulador positivo da angiogênese, sendo que sua expressão nas células neoplásicas bem como no estroma de tumores prostáticos induz a formação de vasos sanguíneos (Kwabi-Addo *et al.*, 2004). O FGF-2 é membro da família dos FGFs, os quais são expressos em quase todos os tecidos e desempenham importantes papéis em processos normais e patológicos, como desenvolvimento,

cicatrização e transformação neoplásica (Kwabi-Addo *et al.*, 2004). Na próstata, as células estromais representam o principal sítio de produção de FGFs, sobretudo dos FGFs 2, 7 e 9, os quais podem atuar como fatores de crescimento parácrinos sobre o epitélio através da interação com receptores de alta afinidade (FGFRs) (Kwabi-Addo *et al.*, 2004). Já no câncer prostático, o aumento na sinalização dos FGFs resulta em amplo espectro de efeitos envolvendo tanto as células tumorais como o estroma, particularmente os vasos sanguíneos (Kwabi-Addo *et al.*, 2004). Em camundongos TRAMP, verificou-se que alterações específicas na expressão de moléculas da família FGF estariam envolvidas na iniciação angiogênica e na progressão do câncer de próstata (Huss *et al.*, 2001; Huss *et al.*, 2003a).

Enquanto obtém seus nutrientes da vasculatura pré-existente, um tumor só pode atingir poucos milímetros de diâmetro. Assim, é fato conhecido que existe estreita relação entre a angiogênese, o crescimento tumoral e o desenvolvimento de metástases (van Moorselaar & Voest, 2002; Abdollahi *et al.*, 2003; Reynolds & Kyrianiou, 2006). Nesse contexto, as células endoteliais recrutadas pelo tumor para sustentar seu crescimento emergem como importante alvo terapêutico, sendo que o desenvolvimento de inibidores angiogênicos constitui uma abordagem promissora no tratamento do câncer, uma vez que as células endoteliais são geneticamente estáveis e portanto menos sujeitas ao acúmulo de mutações que lhes permitiriam desenvolver resistência a fármacos (Abdollahi *et al.*, 2003; Retter *et al.*, 2003; Folkman, 2006). Outro aspecto importante da terapia de inibição da angiogênese é sua conhecida seletividade. Considerando que o *turnover* das células endoteliais em tecidos adultos é muito lento (cerca de um ano) quando comparado ao das células endoteliais envolvidas na angiogênese tumoral (4 dias), a inibição específica da proliferação destas células pode afetar lesões malignas com efeitos colaterais insignificantes para o hospedeiro, uma vez que a angiogênese está limitada em adultos (Castronovo & Belotti, 1996; Retter *et al.*, 2003).

Os inibidores da angiogênese têm sido divididos em duas classes: inibidores diretos e indiretos (Folkman & Hlatky, 1998; Retter *et al.*, 2003). Os inibidores diretos atuam sobre as células endoteliais, impedindo que elas respondam a vários estímulos para a angiogênese, enquanto os inibidores indiretos interferem na comunicação pró-angiogênica entre as células tumorais e o endotélio vascular (Folkman & Hlatky, 1998). Esse efeito inibitório indireto pode ser alcançado pela inibição da expressão de fatores angiogênicos no tumor, como o VEGF e o FGF-2; bloqueio da atividade ou neutralização de proteínas pró-angiogênicas em circulação; ou ainda bloqueando a expressão ou

ativação dos receptores de fatores angiogênicos nas células endoteliais, por exemplo o VEGFR (Folkman & Hlatky, 1998).

A endostatina é um fragmento da extremidade C-terminal do colágeno XVIII, localizado nas paredes vasculares e membranas basais, sendo gerada a partir da clivagem proteolítica de seu precursor (Sim *et al.*, 2000; Folkman, 2006). É um potente inibidor endógeno da angiogênese cuja ação é direta e ocorre por inibição da migração e proliferação das células endoteliais, além de indução de apoptose das mesmas e de células tumorais (O'Reilly *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 2005). Assim, a endostatina apresenta potencial anti-tumoral, exercendo seus efeitos por inibição da vascularização e do fornecimento de sangue aos tecidos neoplásicos (O'Reilly *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 2005). Diferentes autores demonstraram que tumores murinos regressaram para lesões microscópicas dormentes mediante terapia sistêmica com injeções diárias de endostatina (Boehm *et al.*, 1997; O'Reilly *et al.*, 1997).

Dentre os inibidores angiogênicos sintéticos, a droga que apresentou o mais amplo espectro antitumoral em estudos pré-clínicos foi o TNP-470, um análogo sintético da fumagilina, a qual consiste em um antibiótico de ação antiangiogênica produzido pelo fungo *Aspergillus fumigatus fresenius* (Castronovo & Belotti, 1996; Folkman, 2006). Na tentativa de produzir análogos com atividade antiangiogênica similar à da fumagilina, mas sem seus efeitos tóxicos, foram produzidos mais de 100 derivados sintéticos, dentre os quais foi identificado o O-(cloroacetilcarbamoil)-fumagilol (TNP-470), um potente inibidor da angiogênese (Castronovo & Belotti, 1996). Este composto é 50 vezes mais ativo do que a fumagilina, exibindo intenso efeito inibitório sobre a proliferação e migração de células endoteliais, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Castronovo & Belotti, 1996; Gervaz *et al.*, 2000; Matsusaka *et al.*, 2000). O mecanismo de ação do TNP-470 não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que ele pode inibir especificamente a síntese de DNA nas células endoteliais, indicando que a molécula afeta uma ou várias etapas do ciclo celular e tem ação antiangiogênica direta (Castronovo & Belotti, 1996; Figg *et al.*, 2002).

O SU5416 é um pequeno composto sintético lipofílico de ação indireta que inibe seletivamente a atividade do domínio quinase de tirosina do receptor VEGFR2, impedindo sua dimerização e consequente autofosforilação na presença de VEGF (Fong *et al.*, 1999). Estudos demonstraram que o SU5416 inibiu a migração de células endoteliais humanas *in vitro* e que a administração dessa droga em modelos *in vivo* enxertados com diferentes linhagens de câncer levou à inibição dos processos de angiogênese, metástases e proliferação tumoral, além de resultar em acréscimo da apoptose de células

tumorais e endoteliais (Fong *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 2000; Takamoto *et al.*, 2001). Entretanto, sabe-se que os tumores prostáticos, além de apresentarem diferenças genéticas, também são heterogêneos em relação à angiogênese, sendo capazes de produzir diferentes fatores angiogênicos ao longo de seu desenvolvimento (Yoshiji *et al.*, 1997; Doll *et al.*, 2001). Assim, terapias antiangiogênicas indiretas podem ser ineficazes, uma vez que células tumorais produtoras de outro fator pró-angiogênico podem ser selecionadas, tornando o tumor capaz de anular o efeito inibitório (Doll *et al.*, 2001; Abdollahi *et al.*, 2003). Segundo Abdollahi *et al.* (2003), protocolos que combinem inibidores angiogênicos diretos e indiretos são necessários para a obtenção de resultados mais satisfatórios.

Por fim, considerando que os andrógenos são potentes estimuladores da angiogênese prostática, inibidores da 5 $\alpha$ -redutase têm sido utilizados em terapias antiangiogênicas direcionadas ao órgão. Nesse sentido, diversos estudos utilizaram a finasterida no tratamento da hematúria, um sintoma comumente verificado em pacientes com HBP e que está associado à angiogênese, aumento da permeabilidade e densidade vascular e maior fluxo sanguíneo no tecido prostático (Miller & Puchner, 1998; Foley & Bailey, 2000).

## 2. JUSTIFICATIVA

A próstata possui importância fundamental no processo reprodutivo masculino, sendo também o órgão mais frequentemente acometido por lesões neoplásicas em homens. Além disso, sabe-se que o envelhecimento propicia um microambiente glandular favorável ao desequilíbrio das sinalizações parácrinas, permitindo a ocorrência de alterações celulares que podem progredir para um fenótipo maligno. Esse microambiente caracteriza-se pelo acúmulo simultâneo de células epiteliais transformadas e células estromais senescentes, as quais secretam níveis aumentados de enzimas remodeladoras da MEC, citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e angiogênicos. Dessa forma, a senescência está associada a modificações no compartimento estromal, gerando um microambiente semelhante ao estroma reativo observado nos processos de cicatrização e desenvolvimento tumoral.

Assim, o estroma, inicialmente visto como um simples componente estrutural e de suporte passivo com pequena importância funcional, tem sido apontado como um ambiente dinâmico, exercendo influência direta sobre o compartimento epitelial nos diferentes órgãos, incluindo a próstata, tanto em condições normais como patológicas. Sabe-se ainda que existe estreita relação entre a angiogênese, um processo estimulado no estroma reativo, e o crescimento e desenvolvimento de doenças prostáticas. Sendo assim, a inibição da neovascularização tem sido apontada como uma abordagem promissora no tratamento do câncer e da HBP, seja com o uso de inibidores angiogênicos diretos ou indiretos, ou por meio de drogas que interferem na sinalização androgênica prostática, como a finasterida. Além disso, tendo em vista a heterogeneidade do processo de angiogênese nas neoplasias malignas, sugeriu-se que a combinação de inibidores angiogênicos diretos e indiretos pode representar terapias mais promissoras.

Apesar do exposto, pouco se sabe a respeito dos efeitos da senescência sobre o estroma prostático, sendo que a ampliação desse conhecimento é de grande interesse, considerando a idade como principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer e a capacidade do estroma reativo induzir alterações malignas no epitélio. Assim, o estudo da reação estromal associada à ocorrência do câncer do modelo TRAMP constitui uma importante ferramenta para avaliar de que modo as alterações observadas no estroma prostático durante a senescência poderiam predispor a lesões malignas, considerando os parâmetros moleculares. Por fim, tendo em vista que a angiogênese está estimulada no microambiente prostático na senescência, a utilização de terapias antiangiogênicas pode apontar potenciais formas de tratamento dessas alterações.



### 3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar os efeitos moleculares da senescência sobre o estroma do lobo dorsolateral da próstata de camundongos e avaliar a influência das terapias antiangiogênica e de ablação hormonal sobre o microambiente glandular do indivíduo senil, comparando o padrão de reação estromal observado com diferentes graus de estroma reativo associado a lesões prostáticas no modelo TRAMP. Tal objetivo geral foi alcançado através dos seguintes objetivos específicos:

a) Caracterização da morfologia dos compartimentos epitelial e estromal da próstata dorsolateral de camundongos FVB jovens, senis e senis submetidos a terapias antiangiogênicas e/ou de ablação hormonal, bem como de camundongos TRAMP em diferentes estágios de lesões glandulares;

b) Caracterização do estroma prostático por imunolocalização e/ou quantificação do nível proteico (Western Blotting) das moléculas MMP-9, IGFR-1, VEGF, HIF-1 $\alpha$ , FGF-2, endostatina, TGF- $\beta$ , VIM e  $\alpha$ SMA na próstata dorsolateral de camundongos FVB jovens, senis e senis submetidos a terapias antiangiogênicas e/ou de ablação hormonal, bem como de camundongos TRAMP em diferentes estágios de lesões glandulares.

c) Determinação da densidade de microvasos através da imunolocalização de células endoteliais com o marcador CD31 no lobo dorsolateral da próstata de camundongos FVB jovens, senis e senis submetidos a terapias antiangiogênicas e hormonal, bem como de camundongos TRAMP em diferentes estágios de lesões glandulares;

d) Identificação da ocorrência de populações celulares em processo de EndMT na próstata dorsolateral de camundongos senis, comparando esses achados às observações realizadas em diferentes estágios de lesão glandular no modelo TRAMP e verificando a possível interferência das terapias antiangiogênica e/ou de ablação hormonal na ativação de células estromais através desse mecanismo durante a senescência.





#### 4. ARTIGO CIENTÍFICO I

**“Antiangiogenic therapy effects on age-associated matrix metalloproteinase (MMP-9) and insulin-like growth factor receptor-1 (IGFR-1) responses: A comparative study of prostate disorders in aged and TRAMP mice”**

Fabio Montico<sup>1</sup>; Larissa Akemi Kido<sup>1</sup>; Amanda Cia Hetzl<sup>1</sup>; Raísa Mistieri Lorencini<sup>1</sup>; Eduardo Marcelo Cândido<sup>1</sup>; Valéria Helena Alves Cagnon<sup>1</sup>.

**Versão do artigo original publicado no periódico *Histochemistry and Cell Biology*.**

1- Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, 13083-865, Campinas, São Paulo, Brazil.

Correspondence to: Valéria H. A. Cagnon PhD, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, 13083-865, Campinas, São Paulo, Brazil. Telephone: (+55) (19) 3521-6103. Fax: (+55) (19) 3289-3124. E-mail: quitete@unicamp.br.

#### **4.1. ABSTRACT**

Angiogenesis is fundamental for the progression of malignant lesions and is a promising target for the treatment of prostate cancer, an age-associated disease. The aim herewith was to characterize MMP-9 and IGFR-1 responses in the prostate during senescence and following antiangiogenic and/or androgen ablation therapies, comparing them to cancer progression features in TRAMP mice. Aged male mice (52-week-old FVB) were submitted to antiangiogenic treatments with SU5416 (6 mg/kg; i.p.) and/or TNP-470 (15 mg/kg; s.c). Finasteride (20 mg/kg; s.c.) was administered alone or associated to both inhibitors. Dorsolateral prostate was collected for light microscopy, immunohistochemistry and Western blotting for MMP-9 and IGFR-1. Senescence led to inflammation and different proliferative lesions in the prostate, as well as to increased MMP-9 and IGFR-1, resembling TRAMP mice prostatic microenvironment. Antiangiogenic therapies promoted recovery and/or interruption of age-associated alterations, presenting differential effects on the molecules studied. SU5416 acted mainly on MMP-9, whereas TNP-470 showed its best influence on IGFR-1 levels. Finasteride administration, alone or in combination with antiangiogenic agents, also resulted in regression of inflammation and neoplastic lesions, besides having a negative modulatory effect on both MMP-9 and IGFR-1. We concluded that stimulated tissue remodeling and proliferative processes during senescence predisposed the prostate to malignant disorders. The combination of different agents was more effective to minimize prostatic imbalance during this period, probably due to the differential action of each drug on factors involved in cell proliferation and extracellular matrix remodeling, resulting in a broader spectrum of effects following the combined treatment.

**Key-words:** Prostate, senescence, angiogenesis, TRAMP, MMP-9, IGFR-1.

## 4.2. INTRODUCTION

Angiogenesis is the development of new blood vessels from the preexisting vasculature and displays important roles in growth, development and tumorigenesis (van Moorselaar and Voest 2002). Malignant tumors induce their own neovascularization to provide the nutrients and oxygen necessary for their growth (Condon 2005; Tuxhorn et al. 2001). This angiogenic process is regulated by the relative balance between inducing and inhibiting factors in the tumor microenvironment, which may be secreted by tumor cells, stromal cells or solubilized from the extracellular matrix (ECM) (Tuxhorn et al. 2001; van Moorselaar and Voest 2002).

It is well known that tumors can reach only few millimeters in diameter while their nutrients are derived from the preexisting vasculature, showing the close relationship among angiogenesis, tumor growth and metastasis (Abdollahi et al. 2003; Reynolds and Kyprianou 2006; van Moorselaar and Voest 2002). Thus, the endothelial cells recruited by the tumor to sustain its growth emerge as important therapeutic targets for cancer treatment and a promising approach in this field is the development of angiogenic inhibitors, which have been divided into two categories (Abdollahi et al. 2003; Folkman 2006; Folkman and Hlatky 1998; Retter et al. 2003). The first group acts directly on the endothelial cells, preventing their response to several angiogenic stimuli, whereas the indirect agents interfere in the pro-angiogenic crosstalk between tumor cells and the vascular endothelium, for example by blocking the angiogenic factor receptor activation in endothelial cells (Folkman and Hlatky 1998; Retter et al. 2003).

SU5416 is a synthetic indirect anti-angiogenic agent acting through the selective inhibition of the vascular endothelial growth factor (VEGF)-dependent phosphorylation of tyrosin residues on the VEGFR-2 receptor (Aragon-Ching and Dahut 2009; Fong et al. 1999). VEGF is the most potent mediator of new blood vessel formation and endothelial cell functions, stimulating their proliferation and migration, protecting them from apoptosis as well as increasing the permeability of vascular endothelium and promoting the formation of endothelial cell tubes (van Moorselaar and Voest 2002). Regarding the direct antiangiogenic agents, TNP-470 is a synthetic analogue of fumagillin, an antibiotic produced by the *Aspergillus fumigatus fresenius* fungus (Castronovo and Belotti 1996; Folkman 2006). This drug shows intense inhibitory effect on endothelial cell proliferation and migration both *in vitro* and *in vivo* (Castronovo and Belotti 1996; Gervaz et al. 2000; Matsusaka et al. 2000). Different studies have indicated that TNP-470 inhibits DNA synthesis in endothelial cells and affects one or several steps of the cell cycle, suppressing

the expression and/or activation of cyclins, cyclin-dependent kinases and of the methionine aminopeptidase protein (MetAP-2), which is another potential cell cycle regulator (Castronovo and Belotti 1996; Figg et al. 2002; Sin et al. 1997; Turk et al. 1999). Furthermore, considering that androgens are potent stimulators of prostatic angiogenesis, 5 $\alpha$ -reductase enzyme inhibitors such as finasteride have been used in antiangiogenic therapies directed to the organ (Miller and Puchner 1998; Häggström et al. 2002; Pareek et al. 2003).

Senescence is a period of life in which diseases involving the genitourinary tract commonly occur due to an imbalanced hormonal microenvironment (Anawalt and Merriam, 2001; Roy-Burman et al., 2004; Rullis et al., 1975). In the prostate, men show progressive 5 $\alpha$ -reductase reduction in the glandular epithelium, leading to decreased DHT levels during aging (Krieg et al. 1993). In contrast, there is an estradiol increase in the prostatic stroma, resulting in the enhancement of the potential pathogenic role of estrogens in the prostate of elderly human beings (Krieg et al. 1993). Moreover, many factors involved in tissue remodeling, proliferation and angiogenesis, such as insulin-like growth factor (IGF-1) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), are upregulated in the prostatic microenvironment in this period due to the accumulation of senescent fibroblasts whose transcription program is altered (Krtolica and Campisi 2002; Sprenger et al. 2008). Thus, these senescent cells are phenotypically similar to cancer associated fibroblasts (CAFs), which secrete factors involved in increasing the survival and invasion capacities of the developing carcinoma cells, creating a permissive microenvironment for the development of prostate cancer (Coppé et al. 2006; Krtolica and Campisi 2002; Olumi et al. 1999; Sprenger et al. 2008).

Thus, the aim of this study was to analyze MMP-9 and IGF-1 receptor (IGFR-1) responses in the prostatic microenvironment during senescence and following antiangiogenic and/or androgen blockage therapies, comparing them to the characteristics in different lesion grades of TRAMP mice prostate.

### **4.3. MATERIALS AND METHODS**

#### **4.3.1. Animals and experimental procedures**

A total of 56 male FVB mice and 16 male transgenic TRAMP mice (C57BL/6-Tg(TRAMP)8247Ng/J X FVB/NJ)F1/J) provided by the Multidisciplinary Center for Biological Investigation on Laboratory Animal Science (CEMIB) at the University of

Campinas were divided into nine groups. Control groups were submitted to the same conditions as the experimental groups and were as follows: Young Control (YNG) (18 week-old FVB mice), Prostatic Intraepithelial Neoplasia Control (PIN) (8 week-old TRAMP mice) and Cancer Control (PC) (18-week-old TRAMP mice). Experimental groups were made up of 52-week-old FVB mice submitted to the following treatments: Senile Group (SEN): received the same treatment as controls; SU5416 Group (SU): 6 mg/kg SU5416 (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, USA) diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) (i.p.) (altered Strieth et al. 2006); TNP-470 Group (TNP): 15 mg/kg TNP-470 (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, USA) diluted in DMSO (s.c.) (altered Matsusaka et al. 2000); SU5416 + TNP-470 Group (ST): received the same treatments as SU and TNP groups; Finasteride Group (FIN): 20 mg/kg finasteride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in DMSO (s.c.) (altered Gonzales et al. 2008; altered Tutrone et al. 1993); SU5416 + TNP-470 + Finasteride Group (STF): received the same treatments as SU, TNP and FIN groups.

All mice received water and solid ration *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brazil). After 21 days of treatment every other day, the animals were weighed on a Marte AS 5500 semi-analytical scale (São Paulo, Brazil), anesthetized with 2% xylazine hydrochloride (5 mg/kg; König, São Paulo, Brazil) and 10% ketamine hydrochloride (60 mg/kg; Fort Dodge, Iowa, USA) and euthanized. Samples from the dorsolateral prostatic lobe were collected and processed for light microscopy, immunohistochemical and Western Blotting analyses.

This study was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (University of Campinas - Unicamp, protocol nº. 2386-1) and the experiments were carried out in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA).

#### **4.3.2. Light microscopy**

Dorsolateral prostate samples were collected from four animals per group and fixed in Bouin's solution during 24 hours. After fixation, the tissues were washed in 70% ethanol and subsequently dehydrated in an increasing alcohol series, diaphanized in xylene for 2 hours and embedded in paraffin and plastic polymers (Paraplast Plus, St. Louis, USA). The samples were then cut into 5 µm thick sections in the Hyrax M60 microtome (Zeiss, Munich, Germany) and submitted to Hematoxylin-eosin and Masson's trichrome (Junqueira et al. 1979) staining procedures. The slides were photographed with a Nikon Eclipse E-400 photomicroscope (Nikon, Tokyo, Japan) and prostatic lesions were diagnosed based on the morphological criteria proposed by Gingrich et al. (1999).

### **4.3.3. Immunohistochemistry**

Samples of the dorsolateral prostate from four animals per group, the same used for light microscopy analyses, were utilized for immunohistochemistry. The material were cut into 5 µm thick sections using the Hyrax M60 microtome (Zeiss, Munich, Germany) and collected in silanized slides. After deparaffinization in xylene, the sections were hydrated in a decreasing alcohol series and rinsed under distilled water. Antigen retrieval was performed by boiling the sections in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) three times for 5 min in a microwave oven. Endogenous peroxidase blockade was achieved with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3% in methanol) for 20 min and followed by incubation of the sections in bovine serum albumin (3% BSA in TBS-T buffer) for 1h at room temperature to block nonspecific binding. The MMP-9 and IGFR-1 antigens were detected using the goat polyclonal C-20 antibody (sc-6840) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) and rabbit polyclonal N-20 antibody (sc-712) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA), respectively, diluted in 1% BSA (1:25 for MMP-9 and 1:50 for IGFR-1) and applied to the sections overnight at 4°C. The sections were then washed three times for 5 min with TBS-T and subsequently incubated in HRP-conjugated secondary antibodies for 2h at room temperature. The secondary antibodies used were donkey anti-goat IgG (sc-3851) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) and goat anti-rabbit IgG (W4018) (Promega Corporation, Madison, WI, USA). After a new series of washing in TBS-T, peroxidase activity was detected using a diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) chromogen solution for 10 min. Sections were then lightly counterstained with Harris Hematoxylin, dehydrated in an increasing ethanol series, and xylene, then mounted in Entellan (Merck, Darmstadt, Germany) and photographed in a Nikon Eclipse E-400 photomicroscope (Nikon, Tokyo, Japan). The DAB precipitate, which indicates positive antibody reaction, was evaluated in prostate sections from six animals per group. The distribution of immunoreactivities was graded on a 0-3 scale, according to the percentage of positive areas for each antigen in ten microscopic fields under 400X magnification: 0 (absent) = 0%; 1 (weak) = 1-33%; 2 (moderate) = 34-66%; and 3 (intense) = more than 66% (altered Tuxhorn et al. 2002).

### **4.3.4. Western Blotting**

Dorsolateral prostate samples from four animals per experimental group were collected and frozen for Western Blotting procedures. The samples were weighed and

homogenized in a Polytron homogenizer (Kinematica Inc., Lucerne, Switzerland) in a 50  $\mu$ L/mg RIPA lysis buffer (Millipore, Temecula, California, USA). The tissue extracts were centrifuged at 14000 rpm for 20 min at 4°C and an aliquot of each sample was used for protein quantification using Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). The supernatants were mixed (1:1) with 3X Laemmli buffer and transferred to a dry bath at 100°C for 5 min. Aliquots containing 75  $\mu$ g of protein were separated by electrophoresis in SDS-PAGE gels under reducing conditions, with subsequent electrical transfer of the proteins to Hybond-ECL nitrocellulose membranes (Amersham, Pharmacia Biotech, Arlington Heights, USA) at 70V for 3h. The membranes were blocked with 3% BSA in TBS-T for 1h and incubated at 4°C overnight with the same MMP-9 and IGFR-1 primary antibodies used for immunohistochemistry in a dilution range of 1:350-1:500 in 1% BSA. After washing in TBS-T, the membranes were incubated for 2h with the same HRP-conjugated secondary antibodies utilized for immunostaining diluted in a 1:5000-1:10000 dilution range. The protein band detection was performed after a new series of washing in TBS-T through the incubation of the membranes in the chemiluminescent solution (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) for 5 min, followed by fluorescence capture using the Gene Gnome equipment and the Gene Sys image acquisition software (Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK).  $\beta$ -actin mouse monoclonal ACTBD11B7 (sc-81178) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) antibody was used as an endogen control for comparison among groups. The intensity of antigen bands in each experimental group was determined by densitometry using the *Image J (Image Analysis and Processing in Java)* software for image analyses and was expressed as the mean percentage in relation to  $\beta$ -Actin band intensity.

#### **4.3.5. Statistical analysis**

The comparative statistical analysis of MMP-9 and IGFR-1 protein levels among the experimental groups was carried out by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple range test, with the level of significance set at 5% (Montgomery 1991; Zar 1999). The results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation.

## **4.4. RESULTS**

### **4.4.1. Light microscopy**

#### **The Young Control Group (YNG)**

The dorsolateral prostate showed acini lined by folded mucosa and simple secretory epithelium with columnar cells, especially in the dorsal lobe, whereas in the lateral portion the cells presented a cubical aspect (Figs. 1A, 1B, 1C and 1D). Basal cells were intermingled with the luminal cells and frequently showed a pale cytoplasmic halo around the nucleus (Figs. 1B and 1D). Cellular debris was occasionally seen within the glandular lumen of the dorsal lobe (Fig. 1E). Fibroblasts, smooth muscle cells and collagen fibers formed a thin and tightly packed layer surrounding the glandular acini and were also scattered throughout the stroma together with blood vessels (Fig. 1E).

#### **The PIN Control Group (PIN)**

The secretory epithelium showed widespread hyperplasia and areas of cellular atypia, with large nuclei and prominent nucleoli, in addition to epithelial cell stratification, characterizing foci of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) (Figs. 1F and 1G). These PIN lesions showed different architectural patterns, such as papillary projections of the hyperplastic epithelium into the lumen, with rare nuclear atypia (Fig. 1F), as well as pseudocribriform projections partially occupying the acinar lumen and presenting evident atypical nuclei (Figs 1G and 1H). Cells with a pale cytoplasmic halo and apoptotic figures were also frequently observed in the glandular epithelium (Fig. 1G, inset). The stroma presented a thin fibromuscular layer around the acini, despite showing occasional thickening, especially close to epithelial proliferation areas (Figs. 1F and 1G). Invasion of the epithelium into the stroma and epithelial cells scattered in the stromal compartment were also verified, characterizing occasional well-differentiated adenocarcinoma foci (Fig. 1H, 1H inset).

#### **The Cancer Control Group (PC)**

Different grades of PIN and adenocarcinoma were observed. Cribriform PIN foci were characterized by cellular hyperplasia and epithelial projections filling the acinar lumen entirely (Fig. 1I). In addition, areas of epithelial infiltration towards the stroma were



diffusely distributed throughout the gland, characterizing well-differentiated adenocarcinoma (Figs. 1I and 1L). The epithelial cells in these proliferative lesions showed nuclear atypia with large nuclei and evident nucleoli. Furthermore, cell types with pale cytoplasm were observed overlapping the basal membrane, suggesting the presence of basal cells (Figs. 1I, 1I inset and 1L). Epithelial cell detachment from the basal membrane was frequently verified, characterizing the occurrence of periacinar spaces between the acini and the stroma (Fig. 1J). Neoplastic microacini surrounded by thick collagen fibers and scarce smooth muscle cells were occasionally registered (Figs. 1L and 1M). Furthermore, high-grade neoplastic lesions like the poorly differentiated adenocarcinoma were also present, albeit at a lower frequency. Such lesions were characterized by the complete loss of the glandular architecture and by the presence of agglomerated cells, which were more densely disposed around the blood vessels (Fig. 1K).

### **The Senile Group (SEN)**

Drastic glandular changes were verified in the dorsolateral prostate of senile animals. The secretory epithelium showed hyperplasia, characterizing papillary, pseudocribriform and cribriform PIN lesions (Figs. 2A and 2C). Epithelial cells presented nuclear atypia and occasionally a pale cytoplasm, with or without picnotic nuclei, suggesting the occurrence of basal cells in these acini (Fig. 2B). Epithelial atrophy, microacini and loss of adhesion between epithelial cells and basal membrane were also verified (Figs. 2A and 2C). Occasional invasive epithelial foci towards the stroma were observed, showing nuclei with condensed chromatin immersed in the fibromuscular layer around the acini and characterizing well-differentiated adenocarcinoma (Fig. 2D and 2E). The stroma presented inflammatory cell foci, hypertrophy and hyperplasia, with increased fibrillar and cellular components (Figs. 2A, 2C, 2D and 2E).

### **The SU5416 Group (SU)**

The majority of the acini showed folded mucosa and simple secretory epithelium with columnar cells intermingled by basal cells (Fig. 2F). On the other hand, some glandular changes verified in the SEN group were maintained, such as acinar atrophy and microacini, epithelial cells with occasionally flattened nuclei scattered into the lumen and epithelial hyperplasia (Figs. 2G, 2H and 2J). Areas of hyperplastic epithelium were characterized by increased amount of cells with pale cytoplasm, occurrence of PIN and

epithelial stratification (Figs. 2H and 2J). The stroma was hypertrophic, especially in the dorsal region, whereas the lateral lobe showed a thin fibromuscular layer around the acini, suggesting a regression of the stromal changes in this region. Inflammatory cells were not observed, even in the areas where the stroma was still hypertrophic (Figs. 2I and 2J).

### **The TNP-470 Group (TNP)**

Widespread acinar atrophy was the most evident feature in this group (Figs. 2K and 2L). The loss of adhesion between epithelium and basal membrane was commonly verified and characterized by the abundant occurrence of epithelial cells in the glandular lumen, some of which presented squamous shape and flattened nuclei (Fig. 2K and 2L). Microacini were also frequently observed with their lumen completely filled by epithelial cells, especially an atypical population characterized by highly condensed chromatin as well as pale and abundant cytoplasm (Figs. 2K, 2L and 2M). Epithelial invasion towards the stroma was rarely registered (Fig. 2N). Similarly to the SU5416 group, age-associated stromal hypertrophy and hyperplasia were characterized, especially in the dorsal lobe, even though the occurrence of inflammatory cells was scarce (Fig. 2N).

### **The SU5416 +TNP-470 Group (ST)**

Glandular acini showed folded mucosa and were lined by simple secretory epithelium with columnar luminal cells and basal cells (Fig 3A). Recovery of morphology was verified in relation to SEN, SU and TNP groups. However, alterations such as microacini, epithelial atrophy and hyperplasia, including stratification, increased amount of cells with pale cytoplasm and occasional PIN foci, were still observed (Figs. 3B and 3C). The stromal layer of fibroblasts, smooth muscle cells and collagen fibers surrounding the acini was thinner than that verified in the SEN, SU and TNP groups, in both prostatic lobes. Furthermore, there were no inflammatory cells in the stroma (Figs. 3D and 3E).

### **Finasteride Group (FIN)**

Epithelial hyperplasia was the main feature of the dorsolateral prostate acini. Areas of epithelial invasion into the stroma were verified in parallel with papillary and pseudocribiform PIN foci, which showed epithelial cells with nuclear atypia and pale and abundant cytoplasm (Fig. 3F, 3G, 3H and 3J). In addition, an occasional loss of epithelial cell adhesion was registered (Fig. 3I). The stromal compartment showed similar

morphology to that found in the YNG group, despite the occurrence of slight fibromuscular thickening around the acini in some areas, especially in the dorsal lobe (Fig. 3J and 3K).

#### **The SU5416 + TNP-470 + Finasteride Group (STF)**

In the great majority of the glandular area, the secretory epithelium was markedly folded, showing healthy morphology and columnar cells with central nuclei and inconspicuous nucleoli. Basal cells intermingled to the luminal cells and presenting pale cytoplasm were observed, in addition to some cells scattered into the glandular lumen (Fig. 3L). However, scarce areas of nuclear atypia, epithelial hyperplasia and stratification remained in the gland, characterizing PIN lesions (Figs. 3M and 3N). Reduction of age-associated stromal hypertrophy and hyperplasia was verified. In addition, no inflammatory cells were identified (Figs. 3O and 3P).

#### **4.4.2. Immunohistochemistry and Western blotting**

##### **The Young Control Group (YNG)**

Intense epithelial and weak stromal reactivities were verified for MMP-9, representing 104.01% protein levels in relation to the  $\beta$ -Actin standard (Table 1; Figs. 4A and 6). IGFR-1 immunolabeling was absent in the epithelium and moderate in the stroma, showing 77.80% protein levels (Table 1; Figs. 5A and 6).

##### **The PIN Control Group (PIN)**

MMP-9 staining was intense in the epithelium and weak in the stroma (Table 1; Fig. 4B). Furthermore, its protein levels (105.78%) showed no statistical difference in comparison to the YNG group (Fig. 6). On the other hand, significantly increased IFGR-1 protein levels (121.74%) were registered in relation to the young animals (Fig. 6), characterizing intense epithelial and moderate stromal immunolabeling (Table 1; Fig. 5B).

##### **The Cancer Control Group (PC)**

MMP-9 and IGFR-1 immunoreactivities were intense in both prostatic epithelium and stroma (Table 1; Fig. 4C and 5C). These molecules showed 143.25% and 174.13% protein levels, respectively, characterizing significant increase in relation to the YNG and PIN groups in both cases (Fig. 6).

### **The Senile Group (SEN)**

MMP-9 and IGFR-1 immunolabeling was intense in both glandular compartments, similarly to the results in the PC group (Table 1; Figs. 4D and 5D). MMP-9 protein levels (142.09%) were also statistically similar to the value found in that group (Fig. 6). On the other hand, IGFR-1 levels decreased significantly in relation to the PC group (151.54%), although still higher in comparison to the YNG and PIN groups (Fig. 6).

### **The SU5416 Group (SU)**

Weak epithelial and stromal reactivities were verified for MMP-9 and its protein levels (60.99%) statistically decreased in comparison to the SEN group (Table 1; Figs. 4E and 6). IGFR-1 protein levels (110.78%) were also significantly lower in relation to the SEN group, but still increased in relation to young animals, characterizing intense epithelial and moderate stromal immunolabeling for this proliferative factor (Table 1; Figs. 5E and 6).

### **The TNP-470 Group (TNP)**

Intense MMP-9 immunolabeling was verified both in the stroma and epithelium (Table 1; Fig. 4F). However, epithelial reactivity was absent in the areas of cell detachment from the basal membrane. MMP-9 protein levels (137.71%) were statistically similar to those found in the PC and SEN groups (Fig. 6). IGFR-1 reactivity was weak in the epithelium and intense in the stroma, characterizing 95.56% protein levels, which were significantly lower than in the SEN and SU groups, though still higher in relation to the young mice (Table 1; Figs. 5F and 6).

### **The SU5416 +TNP-470 Group (ST)**

MMP-9 immunoreactivity was weak in the epithelium and moderate in the stroma (Table 1; Fig. 4G). This molecule presented 77.51% protein levels, which was an intermediate value between those found in the TNP and SU groups (Fig. 6). Intense epithelial and moderate stromal staining was registered for IGFR-1, whose protein levels (99.51%) were statistically similar to both the SU and TNP groups individually (Table 1; Figs. 5G and 6).

### **The Finasteride Group (FIN)**

Intense MMP-9 immunolabeling was verified in the prostatic epithelium, in contrast to the weak stromal staining for this same molecule (Table 1; Fig. 4H). IGFR-1 reactivity was absent in the epithelium and moderate in the stroma (Table 1; Fig. 5H). MMP-9 and IGFR-1 protein levels were 105.64% and 76.56%, respectively, characterizing a significant decrease in relation to the SEN group and statistical similarity with the young animals for both molecules (Fig. 6).

### **The SU5416 + TNP-470 + Finasteride Group (STF)**

Intense epithelial and weak stromal MMP-9 reactivities were detected, similarly to the FIN group (Table 1; Fig. 4I). MMP-9 protein levels (102.29%) showed statistical similarity with the FIN group and significant increase in relation to the ST group (Fig. 6). IGFR-1 presented weak positivity in the epithelium and moderate labeling in the stroma (Table 1; Fig. 5I), characterizing protein levels (74.37%) statistically similar to the FIN group and lower in comparison to the ST group (Fig. 6).

## **4.5. DISCUSSION**

This study showed that dorsolateral prostate in senescence presented glandular imbalance characterized by proliferative lesions, inflammation and increased MMP-9 and IGFR-1, resembling the prostatic microenvironment verified in the TRAMP mice disorders. Different authors demonstrated that senescence is associated to altered androgen sensitivity in the prostate due to the reduction of androgen receptors and 5 $\alpha$ -reductase enzyme activity as well as increased testosterone to estradiol conversion ratio (Banerjee et al. 1998; Banerjee et al. 2001; Cordeiro et al. 2008; Prins et al. 1996). In addition, androgenic depletion leads to several prostatic morphological changes in elderly rodents, such as epithelial involution and atypia, stromal hypertrophy, hyperplasia of both glandular compartments and inflammatory cell infiltration (Bianchi-Frias et al. 2010; Lau et al. 2003; Montico et al. 2011; Morrissey et al. 2002). Moreover, Campisi et al. (2005) verified that senescent stromal fibroblasts secrete growth factors, MMPs and cytokines which stimulate chronic inflammatory and tissue repair responses, creating a favorable microenvironment to the proliferation of cells with preneoplastic mutations and consequently to prostatic malignancy development.

The TRAMP model has been widely used to study prostate disorders and these mice develop progressive forms of prostate cancer during their lifetime, presenting PIN foci between 6 and 12 weeks of age and primary and metastatic tumors between the ages of 18 and 24 weeks, especially in the dorsolateral prostate (Gingrich et al. 1999; Greenberg et al. 1995). However, there is discussion regarding the criteria adopted to promote the distinction between high-grade PIN lesions and well-differentiated adenocarcinoma in this model (Berman-Booty et al. 2012). In the present study, we adopted the concept of invasion proposed by Gingrich et al. (1999) to characterize adenocarcinoma foci, which considers an invasive lesion to be any group of epithelial cells invading the stromal compartment or rounded nuclei within hypertrophied and hyperplastic fibromuscular stroma surrounding the acini.

MMPs are synthesized by several tissues and are involved in tissue remodeling in both physiological and pathological conditions, such as tumor invasion and metastasis (London et al. 2003; Tuxhorn et al. 2001). Different authors have registered that MMPs show increased expression and activity during senescence and cancer progression (Hetzl et al. 2012; Lynch and Matrisian 2002; Sprenger et al. 2008; Tuxhorn et al. 2001), similar to the results in this study. Prostate tumors, in particular, express increased MMP-2 and MMP-9 levels as they progress to more advanced and metastatic disease (Sprenger et al. 2008). MMPs may influence tumor progression directly through ECM degradation, leading to a favorable microenvironment for cellular migration and invasion, and also by indirect actions, which include the activation and/or solubilization of other pro-MMPs, chemokines, angiogenic and growth factors in the extracellular medium (Sprenger et al. 2008). Taking these aspects into consideration, MMP-9 has emerged as a key component of VEGF-induced angiogenesis in tumors, releasing this pro-angiogenic factor from an extracellular reservoir concomitantly with angiogenesis induction (Bergers et al. 2000; Kong et al. 2007).

IGF-1 has been shown to be upregulated in senescent cells, resulting in raised protein levels of this proliferative factor in the prostatic microenvironment during senescence (Sprenger et al. 2008). This molecule acts as a mitogen in many cell types and its actions are mediated by the IGFR-1 receptor, resulting in increased DNA synthesis, acceleration of cell cycle progression and apoptosis blockade (Djavan et al. 2001; Gennigens et al. 2006). High IGF-1 levels, as well as elevated activity and expression of its receptor, have been related to increased cell proliferation and reduced apoptosis, which may result in malignant transformation in many organs, including the prostate (Gennigens

et al. 2006). In agreement, different authors, including those of the present study, showed raised IGF-1 and IGFR-1 levels during prostate cancer progression, with the existence of a direct association between this receptor expression and tumor grade (Grzmil et al. 2004; Kawada et al. 2008; Ryan et al. 2007). Apart from this, the interaction between IGF-1 and IGFR-1 can upregulate MMP 2 and 9 activities, pointing out that the increased bioavailability of this growth factor accelerates tumor progression not only through its proliferative actions, but also by increasing ECM degradation and hence prostate tumor invasive potential (Lynch and Matrisian 2002; Saikali et al. 2008). On the other hand, MMP-9 is also able to regulate IGF-1-dependent prostatic tumor growth due to its proteolytic action over IGF binding protein-3 (IGFBP-3), which releases free IGF-1 and increases its bioavailability in the tumor microenvironment (Mañes et al. 1999). Furthermore, IGF-1 is capable of reversing the age-associated decline in endothelial cell function, stimulating the expression of pro-angiogenic factors, such as VEGF, through its signaling via IGFR-1 (Miele et al. 2000; Sprenger et al. 2008; Thum et al. 2007).

Our results also pointed out that the antiangiogenic therapy using SU5416 or TNP-470 in elderly mice promoted the recovery and/or interruption of the neoplastic lesions and inflammation foci registered in the prostate during senescence. In addition, while the indirect angiogenic inhibitor showed its main influence on MMP-9, the direct agent acted especially on IGFR-1 levels. On the other hand, the association between direct and indirect angiogenic inhibitors resulted not only in wider morphological recovery in comparison to the isolated treatments, but also decreased both MMP-9 and IGFR-1 in such a manner that the differential action of each drug on these molecules was combined, leading to optimized effects.

VEGF signaling inhibition through SU5416 administration delayed cancer progression in TRAMP mice, reducing microvessel density and increasing the apoptosis ratio in poorly differentiated tumors (Huss et al. 2003). Different studies have shown that SU5416 led to the inhibition of angiogenesis, metastasis and tumor proliferation in xenograft models *in vivo* (Ellis et al. 2000; Fong et al. 1999; Takamoto et al. 2001). Similarly, TNP-470 has inhibitory effects on tumor growth and metastasis development in a wide range of murine and human tumors *in vivo*, either alone or in combination with other therapies, which are mostly attributed to its antiangiogenic action (Castronovo and Belotti 1996; Figg et al. 2002; Matsusaka et al. 2000). According to Sweeney et al. (2002), the treatment with a monoclonal antibody to VEGFR-2, which hence has a similar action to SU5416, led to reduced tumorigenicity and metastasis in prostate cancer xenografts due

to the inhibition of angiogenesis and decreased MMP-9 production by endothelial cells. Later studies also showed that decreased MMP-9 expression represents a mediator mechanism for the antiangiogenic action of several chemotherapeutic agents, due to reduced free VEGF availability in the extracellular medium (Bandyopadhyay et al. 2005; Kong et al. 2007). On the other hand, TNP-470 showed no ability to decrease MMP-9 activity in endothelial cells *in vitro*, not even when combined with another antiangiogenic agent (Minischetti et al. 2000). However, this drug was seen to abolish IGF-1-stimulated increase in the DNA synthesis in vascular smooth muscle cells, indicating an antagonistic action of this drug on IGF-1 signaling (Koyama et al. 1996).

It has been shown that prostate tumors are heterogenic considering angiogenesis, producing different angiogenic factors over the course of their development (Doll et al. 2001; Yoshiji et al. 1997). Thus, indirect antiangiogenic therapies may be ineffective due to the possible selection of tumor cells which synthesize another pro-angiogenic factor, enabling the tumor to nullify the inhibitory effect (Abdollahi et al. 2003; Doll et al. 2001). Abdollahi et al. (2003) verified that the combination of direct and indirect inhibitors, such as endostatin and SU5416, resulted in synergic antiangiogenic effects both *in vitro* and *in vivo*, enhancing the antitumor activity of these agents.

The present results demonstrated that androgen ablation through finasteride administration, either alone or combined with antiangiogenic agents, was also capable of promoting recovery of the senescence-associated prostatic damage, resulting in the absence of inflammation, rare foci of neoplastic lesions as well as negative modulation of both MMP-9 and IGFR-1 levels. Different studies pointed out that androgens are able to upregulate IGF-1 and IGFR-1 expression in prostatic epithelial cells, leading to augmented biological effects of this growth factor on the prostate epithelium (Pandini et al. 2009; Plymate et al. 2004; Wang and Wong 1998). In agreement, Huynh et al. (1998) demonstrated that the suppression of IGF-1 and IGFR-1 receptor genes contributed significantly to the prostate regression following finasteride treatment. On the other hand, considering MMP-9 response, Delella et al. (2010) registered increased gene expression, immunostaining and activity of this enzyme following finasteride administration, suggesting the involvement of this enzyme in prostatic tissue remodeling after androgen ablation. Furthermore, it is known that finasteride leads to increased intraprostatic testosterone levels, especially in the dorsolateral lobe, which might favor the emergence of tumors due to the possible contribution of this hormone to prostatic carcinogenesis (Bosland 1992; Prahallada et al. 1998; Tsukamoto et al. 1995). Indeed, Thompson et al. (2003) verified



that, even though prolonged treatment with finasteride was associated to a 25% reduced risk of prostate cancer development in elderly men, these patients were more susceptible to the occurrence of high grade adenocarcinomas.

Finally, our results showed that the dorsolateral prostate microenvironment in elderly mice presented glandular imbalance, characterized by increase of tissue remodeling and mitogenic factors involved in tumorigenic processes, such as cell proliferation, invasion and angiogenesis. This age-associated imbalance was similar to some structural and molecular features verified in TRAMP mice with different prostate cancer grades, suggesting a tendency towards premalignant and malignant disorders in senescence. Our data also demonstrated the efficacy of both SU5416 and TNP-470 as angiogenesis inhibitors and antitumor agents. However, while the direct antiangiogenic agent influenced especially the IGFR-1 response, the indirect inhibitor also decreased MMP-9 levels, besides leading to a broader recovery and/or interruption of prostatic structural alterations, indicating a trend towards glandular balance restoration. The association between the direct and indirect angiogenesis inhibitors resulted in the decrease of both MMP-9 and IGFR-1 and enhanced the structural recovery in relation to each treatment alone. Similarly, androgen ablation was extremely important to promote prostatic balance in senescence through the reduction of MMP-9 and IGFR-1. Nevertheless, these positive effects must be looked carefully, considering the potential ability of finasteride to promote long-term glandular disorders. Thus, our findings showed that the combination of different chemotherapy agents is more efficient in minimizing glandular imbalance and the associated risk of prostatic malignant lesions during senescence. This fact is related to the activation of distinct molecular pathways by each drug, which differentially influence factors involved in tumor-promoting processes such as cell proliferation and extracellular matrix remodeling, leading to a broader spectrum of effects for the treatment.

## 4.6. APPENDICES

**Table 1.** Distribution of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and insulin-like growth factor receptor-1 (IGFR-1) reactivities in the dorsolateral prostate of the experimental groups.

Molecules	Glandular Compartments	Experimental Groups								
		YNG	PIN	PC	SEN	SU	TNP	ST	FIN	STF
MMP-9	Epithelium	3	3	3	3	1	3	1	3	3
	Stroma	1	1	3	3	1	3	2	1	1
IGFR-1	Epithelium	0	3	3	3	3	1	3	0	1
	Stroma	2	2	3	3	2	3	2	2	2

**Fig. 1** Photomicrographs of the dorsolateral prostate of animals from Young Control (A-E), PIN Control (F-H) and Cancer Control (I-M) groups. **Young Control Group (YNG):** A-D) Acini lined by slightly folded mucosa and simple secretory epithelium with basal cells (Bc) and columnar or cubic luminal cells in the dorsal (A-B) and lateral (C-D) lobes, respectively. E) Fibroblasts (Fb), smooth muscle cells (Smc) and collagen fibers (Col) forming a thin layer surrounding acini. Cellular debris in the glandular lumen of the dorsal lobe (arrow). **PIN Control Group (PIN):** F-G) Papillary and pseudocribiform PIN foci (arrows), respectively. Fibromuscular thickening close to epithelial proliferation areas (white arrowheads). Inset: Apoptotic figures (Ap), cells with large nuclei and prominent nucleoli (arrows) or pale cytoplasmic halo (black arrowheads) in a PIN focus. H) Epithelial invasion into the stroma (asterisks), indicating well-differentiated adenocarcinoma. Inset: Smooth muscle cells (Smc) and collagen fibers (Col) in the stroma adjacent to PIN focus. **Cancer Control Group (PC):** I) Cribriform PIN (arrows) and basal cells (Bc) with pale cytoplasm adjacent to the basal membrane. Inset: Well-differentiated adenocarcinoma showing epithelial infiltration through the basal membrane (black arrowhead) and cells with nuclear atypia (arrows). J) Periacinar space (asterisk). K) Poorly-differentiated adenocarcinoma focus. Tumor cells (arrow). L-M) Well-differentiated adenocarcinoma focus showing microacini, epithelial cells with nuclear atypia (arrows) and epithelial invasion (black arrowheads) into the stroma containing thick collagen fibers (Col). Ep: epithelium; St: stroma; L: lumen; N: nucleus; Bv: blood vessels. A-D, F, G, I-K: Hematoxylin and eosin; E, H, L, M: Masson's trichrome.

**Fig. 2** Photomicrographs of the dorsolateral prostate of animals from Senile (A-E), SU5416 (F-J) and TNP-470 (K-N) groups. **Senile Group (SEN):** A) Cribriform (arrow) and pseudocribriform (black arrowhead) PIN foci. Microacinus (Ma). Inflammatory cells in the stroma (asterisk). B) Cribriform PIN focus characterized by epithelial cells with nuclear atypia (arrows) and cells showing pale cytoplasm with or without picnotic nuclei (black and white arrowheads, respectively). C) Epithelial atrophy (black arrowhead), loss of adhesion between the epithelial cells and basal membrane (arrow) and papillary PIN foci. D-E) Well-differentiated adenocarcinoma presenting epithelial invasion (asterisks) through the basal membrane (black arrowheads) and epithelial cells (white arrowheads) scattered among the stromal fibroblasts (Fb), smooth muscle cells (Smc) and collagen fibers (Col). **SU5416 Group (SU):** F) Acini lined by folded mucosa and simple secretory epithelium. Basal cells (Bc). Cellular debris in the glandular lumen (arrow). G) Acinar atrophy with loss of epithelial adhesion (asterisk) and occasional flattening of epithelial cell nuclei (black arrowheads). H) Hyperplastic epithelium with increased amount of cells with pale cytoplasm (white arrowheads) and stratification (black arrowhead). Inset: PIN foci with nuclear atypia (arrows). I) Intense stromal hypertrophy in the dorsal lobe. J) Thin fibromuscular layer surrounding the acini in the lateral lobe. Epithelial stratification (black arrowhead) and increased amount of cells presenting clear cytoplasm (white arrowheads). **TNP-470 Group (TNP):** K) Epithelial atrophy, microacinus (Ma) and loss of cellular adhesion (asterisks). Inset: Squamous shaped epithelial cells showing flattened nuclei (black arrowheads). L-M) Microacini (Ma) with atypical cells characterized by condensed chromatin and pale and abundant cytoplasm (white arrowheads). N) Stromal hypertrophy and hyperplasia in the dorsal lobe. Rare focus of epithelial invasion into the stroma (arrow). Ep: epithelium; St: stroma; L: lumen; Fb: fibroblast; Smc: smooth muscle cell; Col: collagen fibers; Bv: blood vessels. A-C, F-H, K-M: Hematoxylin and eosin; D, E, I, J, N: Masson's trichrome.

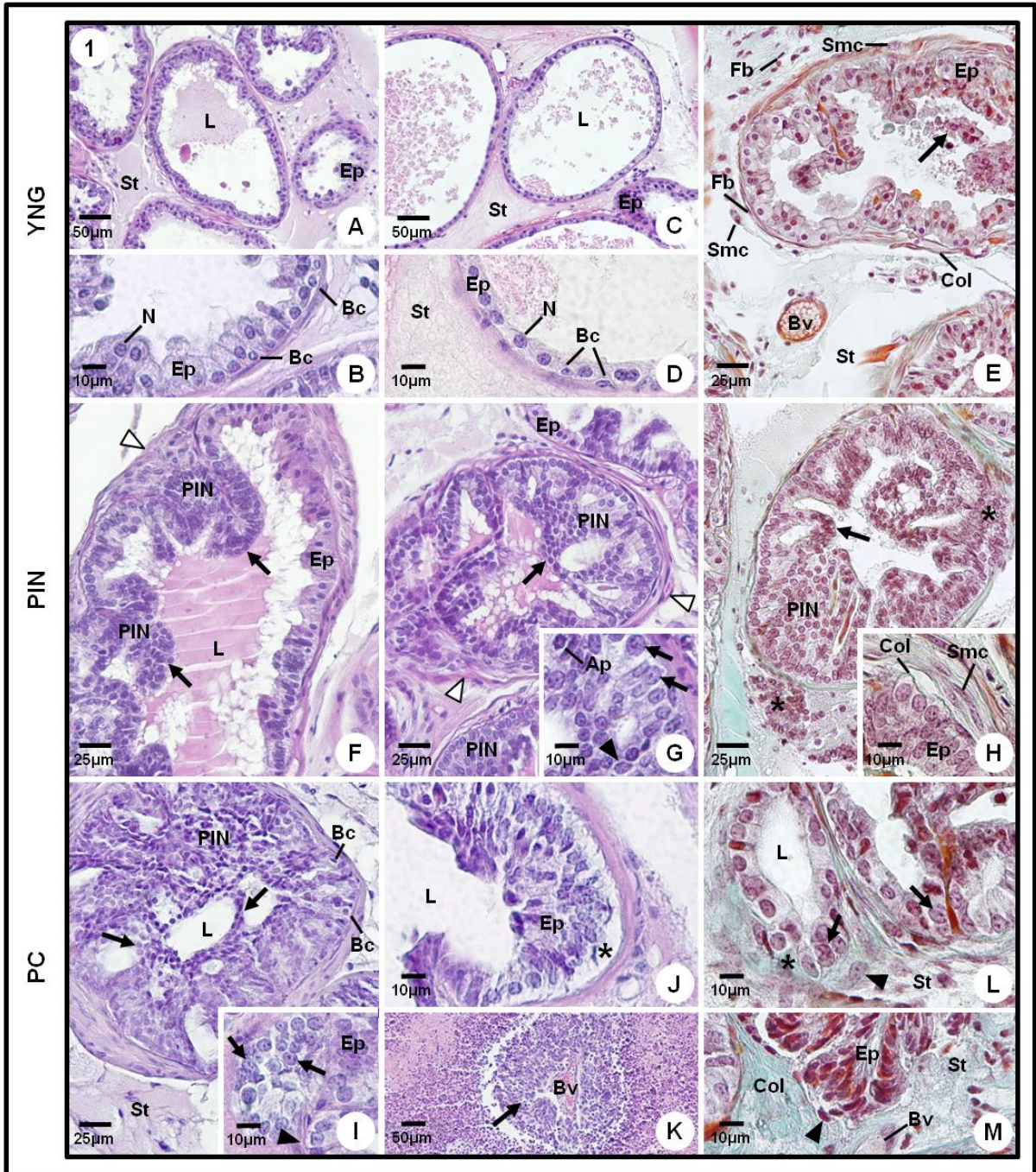
**Fig. 3** Photomicrographs of the dorsolateral prostate of animals from SU5416 + TNP-470 (A-E), Finasteride (F-K) and SU5416 + TNP-470 + Finasteride (L-P) groups. **SU5416 + TNP-470 Group (ST):** A) Folded acinar mucosa and simple secretory epithelium. Columnar luminal cells and basal cells (Bc). B) Atrophic microacinus (Ma) and loss of epithelial adhesion from the basal membrane (asterisks). C) Increased amount of epithelial cells with pale cytoplasm (white arrowheads) and PIN foci with nuclear atypia (Inset, arrows). D-E) Prostatic stroma in the dorsal and lateral lobes, respectively. Slight

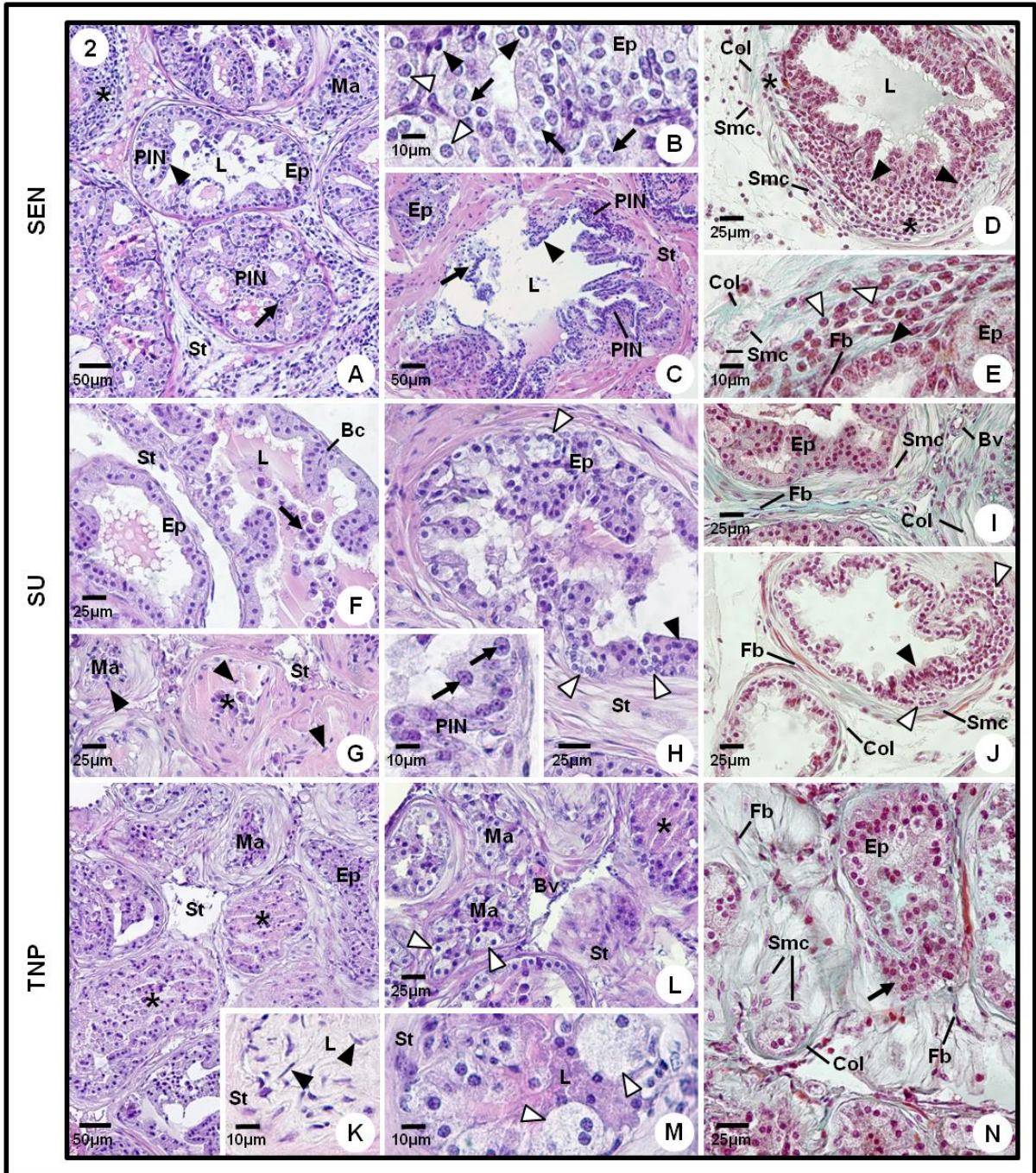
fibromuscular thickening around acini in the dorsal area (arrows). **Finasteride Group (FIN):** F-G) Papillary PIN foci with cells presenting large nuclei and prominent nucleoli (white arrowhead). Occasional epithelial invasion (arrows) through the basal membrane (black arrowhead). H) Pseudocribiform PIN with epithelial infiltration into the stroma (arrow). I) Loss of epithelial cell adhesion (asterisk). J-K) Prostatic stroma in the lateral and dorsal lobes, respectively. PIN focus in the lateral lobe showing cells with nuclear atypia and pale and abundant cytoplasm (white arrowheads). Discrete fibromuscular thickening in the dorsal area (arrow). **SU5416 + TNP-470 + Finasteride Group (STF):** L) Folded acinar mucosa and secretory epithelium with healthy morphology. Basal cells (Bc) and columnar epithelial cells. M-N) Epithelial stratification and PIN foci presenting cells with nuclear atypia (white arrowheads). O-P) Fibroblasts (Fb), smooth muscle cells (Smc) and collagen fibers (Col) forming a slightly thickened (arrow) and a thin layer surrounding acini in the dorsal and lateral lobes, respectively. Ep: epithelium; St: stroma; L: lumen; Bv: blood vessels. A-C, F-I, L-N: Hematoxylin and eosin; D, E, J, K, O, P: Masson's trichrome.

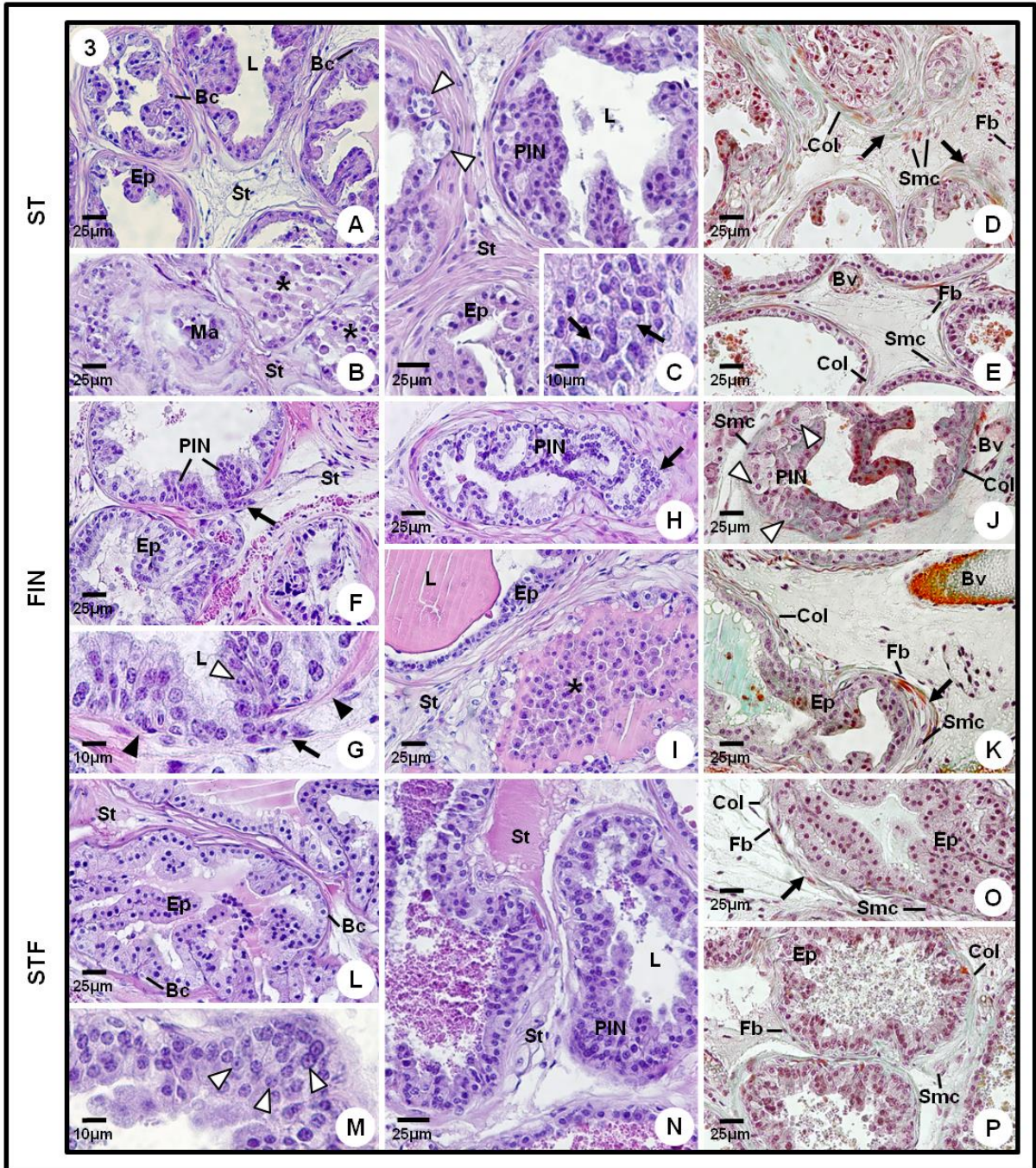
**Fig. 4** Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) immunolabeling in the dorsolateral prostate of the experimental groups. A) Young Control Group (YNG); B) PIN Control Group (PIN); C) Cancer Control Group (CP); D) Senile Group (SEN); E) SU5416 Group (SU); F) TNP-470 Group (TNP); G) SU5416 + TNP-470 Group (ST); H) Finasteride Group (FIN); I) SU5416 + TNP-470 + Finasteride Group (STF). Positive epithelial and stromal immunoreactivities are indicated as arrows and asterisks, respectively.

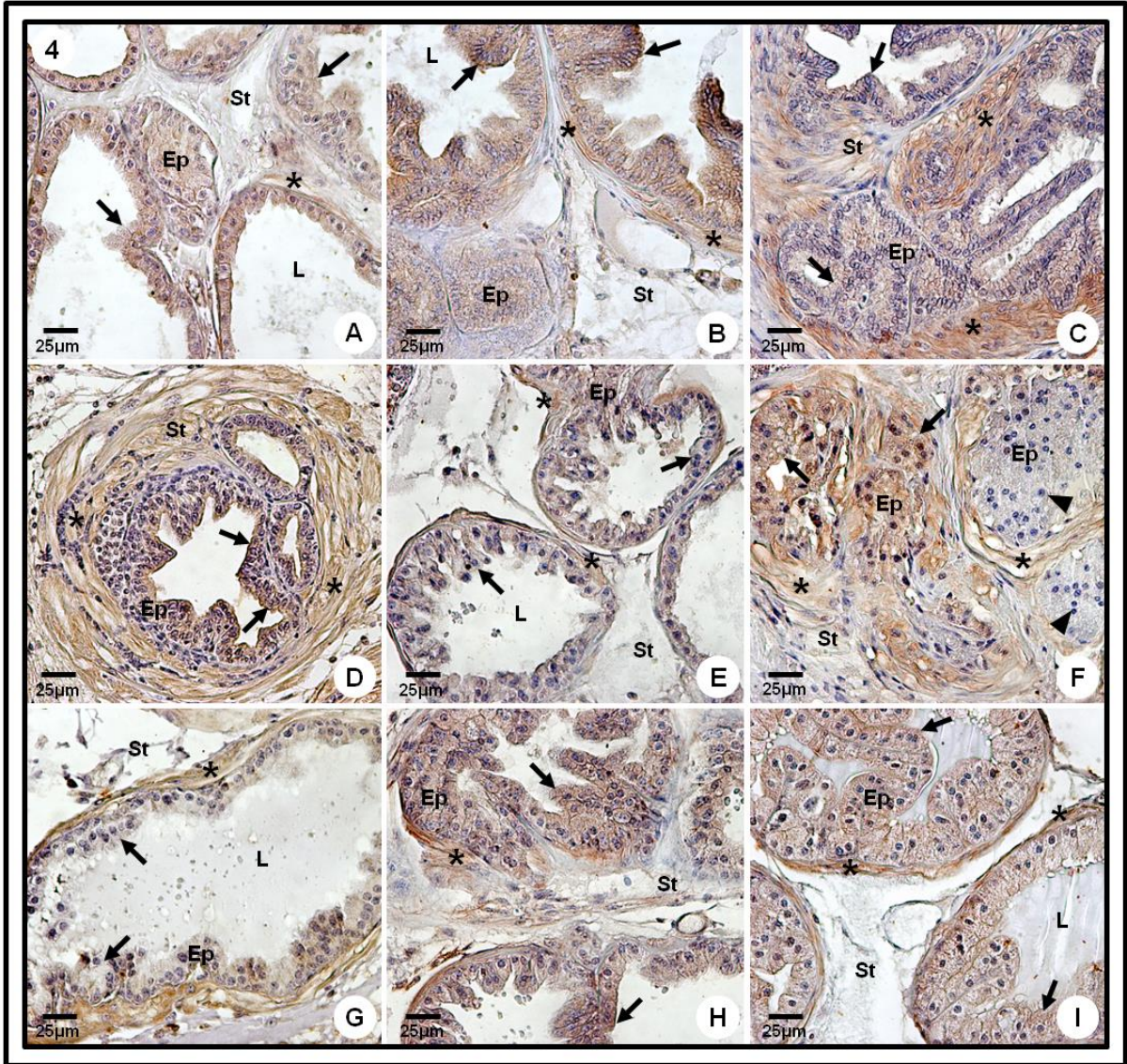
**Fig. 5** Insulin-like growth factor receptor-1 (IGFR-1) immunolabeling in the dorsolateral prostate of the experimental groups. A) Young Control Group (YNG); B) PIN Control Group (PIN); C) Cancer Control Group (CP); D) Senile Group (SEN); E) SU5416 Group (SU); F) TNP-470 Group (TNP); G) SU5416 + TNP-470 Group (ST); H) Finasteride Group (FIN); I) SU5416 + TNP-470 + Finasteride Group (STF). Positive epithelial and stromal immunoreactivities are indicated as arrows and asterisks, respectively.

**Fig. 6** Western blotting and semiquantitative analysis of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and insulin-like growth factor receptor-1 (IGFR-1) protein levels in the dorsolateral prostate of the experimental groups. Data is shown as the mean percentage  $\pm$  standard deviation in relation to the endogenous control  $\beta$ -Actin.

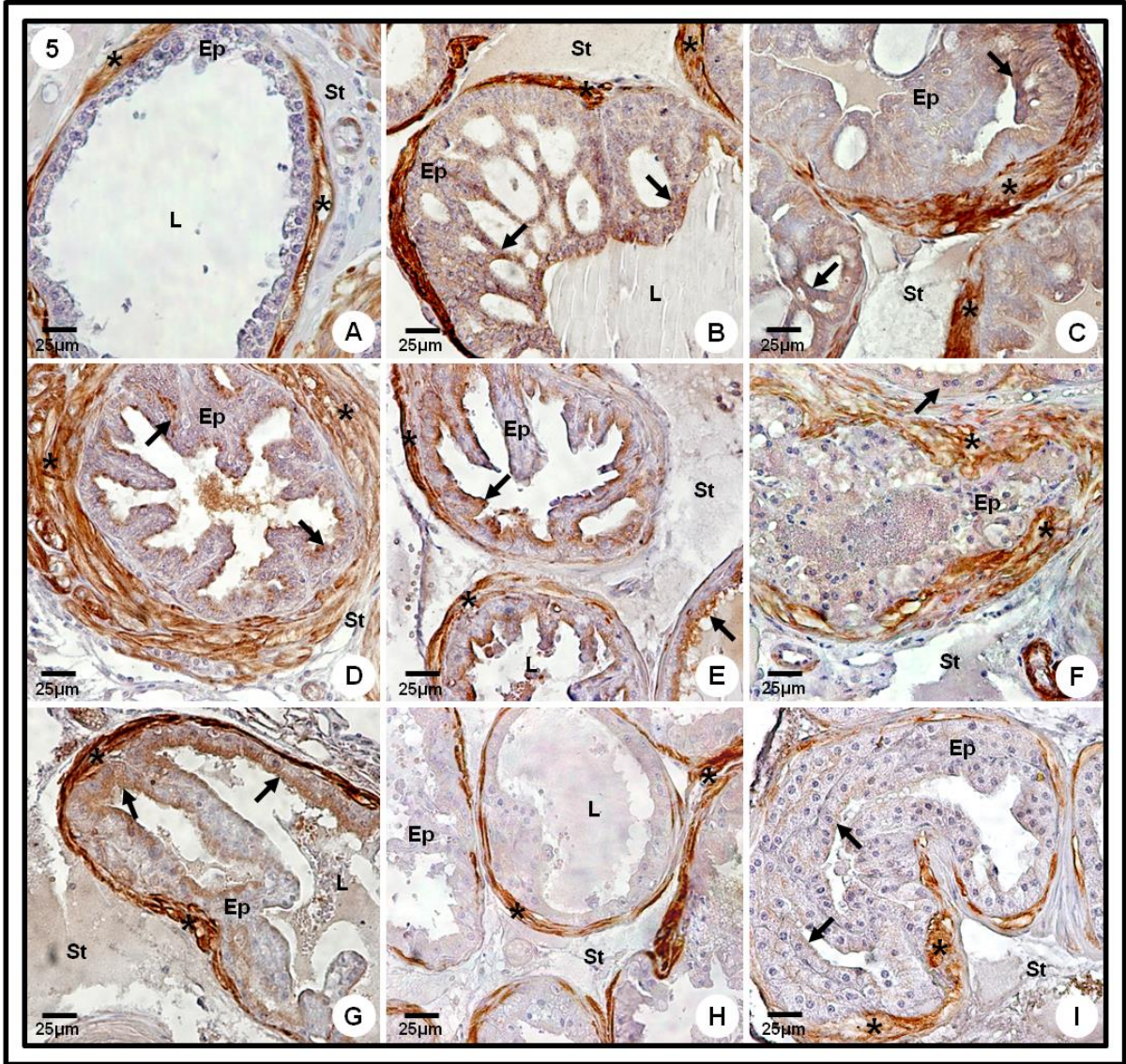




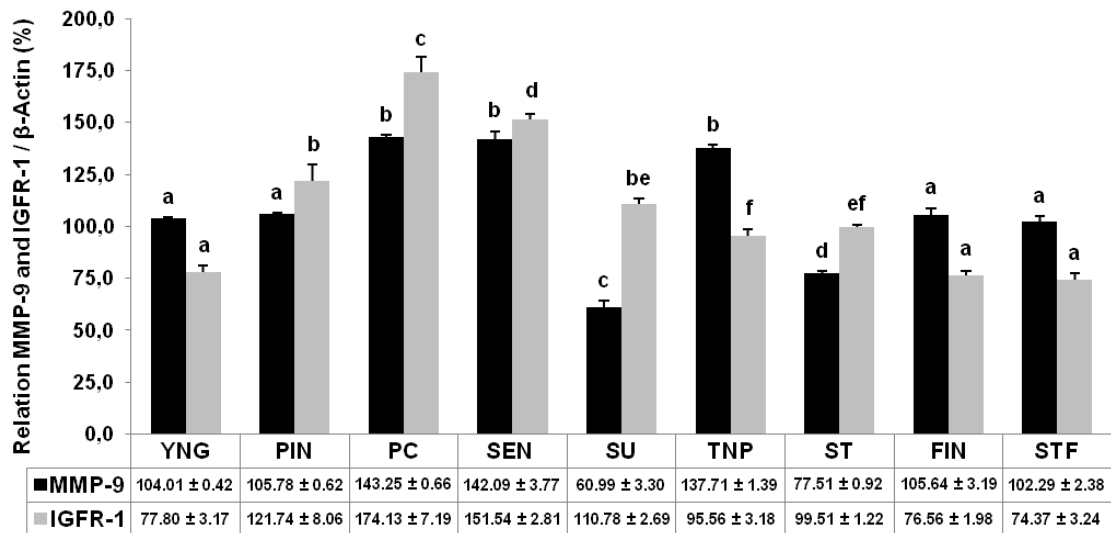
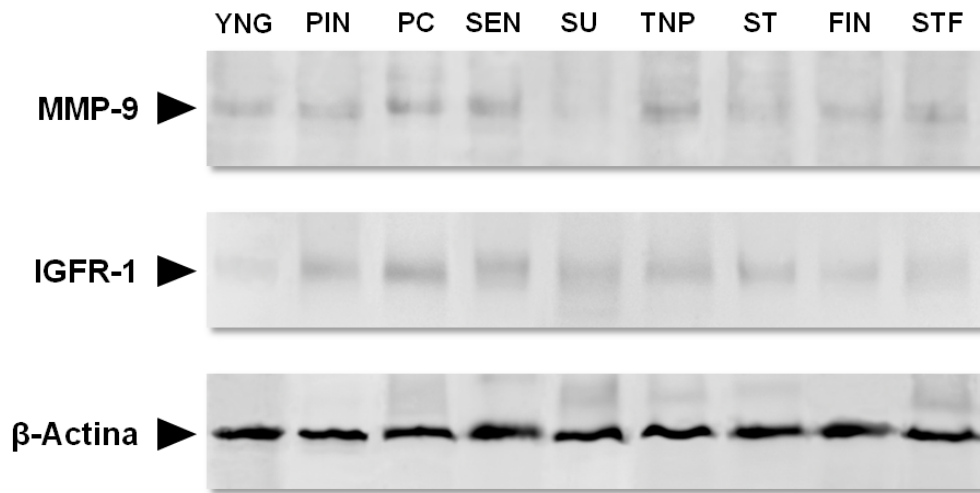








6



Different lowercase letters indicate statistically significant differences among the groups ( $P < 0.05$ ).

## 4.7. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (2011/01968-3 and 2012/03010-4).

## 4.8. REFERENCES

- Abdollahi A, Lipson KE, Sckell A, Zieher H, Klenke F, Poerschke D, Roth A, Han X, Krix M, Bischof M, Hahnfeldt P, Grone HJ, Debus J, Hlatky L, Huber PE (2003) Combined therapy with direct and indirect angiogenesis inhibition results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects. *Cancer Res* 63: 8890-8898.
- Anawalt BD, Merriam BR (2001) Neuroendocrine aging in men. Andropause and somatopause. *Endocrinol Metab Clin North Am* 30: 647-669.
- Aragon-Ching JB, Dahut WL (2009) VEGF inhibitors and prostate cancer therapy. *Curr Mol Pharmacol* 2: 161-168.
- Bandyopadhyay A, Wang L, López-Casillas F, Mendoza V, Yeh IT, Sun L (2005) Systemic administration of a soluble betaglycan suppresses tumor growth, angiogenesis, and matrix metalloproteinase-9 expression in a human xenograft model of prostate cancer. *Prostate* 63: 81-90.
- Banerjee PP, Banerjee S, Lai JM, Strandberg JD, Zirkin BR, Brown TR (1998) Age-dependent and lobe-specific spontaneous hyperplasia in the Brown Norway rat prostate. *Biol Reprod* 59: 1163-1170.
- Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR (2001) Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the Brown Norway rat prostate. *Endocrinology* 142: 4066-4075.
- Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D (2000) Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2: 737-744.
- Berman-Booty LD, Sargeant AM, Rosol TJ, Rengel RC, Clinton SK, Chen CS, Kulp SK (2012) A review of the existing grading schemes and a proposal for a modified grading scheme for prostatic lesions in TRAMP mice. *Toxicol Pathol* 40: 5-17.
- Bianchi-Frias D, Vakar-Lopez F, Coleman IM, Plymate SR, Reed MJ, Nelson PS (2010) The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0012501.
- Bosland MC (1992) Animal models for the study of prostate carcinogenesis. *J Cell Biochem Suppl* 16: 89-98.
- Campisi J (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120: 513-522.
- Castronovo V, Belotti D (1996) TNP-470 (AGM-1470): mechanisms of action and early clinical development. *Eur J Cancer* 32: 2520-2527.
- Condon MS (2005) The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. *Semin Cancer Biol* 15: 132-137.
- Coppé JP, Kauser K, Campisi J, Beauséjour CM (2006) Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem* 281: 29568-29574.
- Cordeiro RS, Scarano WR, Campos SG, Santos FC, Vilamaior PS, Góes RM, Taboga SR (2008) Androgen receptor in the Mongolian gerbil ventral prostate: Evaluation during different phases of postnatal development and following androgen blockage. *Micron* 39: 1312-1324.
- Delella FK, Justulin LA Jr, Felisbino SL (2010) Finasteride treatment alters MMP-2 and -9 gene expression and activity in the rat ventral prostate. *Int J Androl* 33: e114-e122.

- Djavan B, Waldert M, Seitz C, Marberger M (2001) Insulin-like growth factors and prostate cancer. *World J Urol* 19: 225-233.
- Doll JA, Reiher FK, Crawford SE, Pins MR, Campbell SC, Bouck NP (2001) Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate. *Prostate* 49: 293-305.
- Ellis LM, Takahashi Y, Liu W, Shaheen RM (2000) Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. *Oncologist* 5: 11-15.
- Figg WD, Kruger EA, Price DK, Kim S, Dahut WD (2002) Inhibition of angiogenesis: treatment options for patients with metastatic prostate cancer. *Invest New Drugs* 20: 183-194.
- Folkman J (2006) Antiangiogenesis in cancer therapy – endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res* 312: 594-607.
- Folkman JHP, Hlatky L (1998) The logic of anti-angiogenic gene therapy. In: Friedmann T (ed) *The Development of Gene Therapy*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 1-17.
- Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, McMahon G (1999) SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 59: 99-106.
- Gennigens C, Menetrier-Caux C, Droz JP (2006) Insulin-like growth factor (IGF) family and prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 58: 124-145.
- Gervaz P, Scholl B, Padrum V, Gillet M (2000) Growth inhibition of liver metastasis by the anti-angiogenic drug TNP-470. *Liver* 20: 108-113.
- Gingrich JR, Barrios RJ, Foster BA, Greenberg NM (1999) Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2: 70-75.
- Gonzales GF, Gasco M, Malheiros-Pereira A, Gonzales-Castañeda C (2008) Antagonistic effect of *Lepidium meyenii* (red maca) on prostatic hyperplasia in adult mice. *Andrologia* 40: 179-185.
- Greenberg NM, Demayo F, Finegold MJ, Medina D, Tilley WD, Aspinall JO, Cunha GR, Donjacour AA, Matusik RJ, Rosen JM (1995) Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3439-3443.
- Grzmil M, Hemmerlein B, Thelen P, Schweyer S, Burfeind P (2004) Blockade of the type I IGF receptor expression in human prostate cancer cells inhibits proliferation and invasion, up-regulates IGF binding protein-3, and suppresses MMP-2 expression. *J Pathol* 202: 50-59.
- Hägström S, Topping N, Moller K, Jensen E, Lund L, Nielsen JE, Bergh A, Damber JE (2002) Effects of finasteride on vascular endothelial growth factor. *Scand J Urol Nephrol* 36: 182-187.
- Hetzl AC, Fávoro WJ, Billis A, Ferreira U, Cagnon VH (2012) Steroid hormone receptors, matrix metalloproteinases, insulin-like growth factor, and dystroglycans interactions in prostatic diseases in the elderly men. *Microsc Res Tech* 75: 1197-1205.
- Huss WJ, Barrios RJ, Greenberg NM (2003) SU5416 selectively impairs angiogenesis to induce prostate cancer-specific apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2: 611-616.
- Huynh H, Seyam RM, Brock GB (1998) Reduction of ventral prostate weight by finasteride is associated with suppression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-I receptor genes and with an increase in IGF binding protein 3. *Cancer Res* 58: 215-218.
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR (1979) Picrossirius staining plus polarization microscopy, a specific method of collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 11: 447-455.
- Kawada M, Inoue H, Arakawa M, Ikeda D (2008) Transforming growth factor-beta1 modulates tumor-stromal cell interactions of prostate cancer through insulin-like growth factor-I. *Anticancer Res* 28: 751-730.

- Kong D, Li Y, Wang Z, Banerjee S, Sarkar FH (2007) Inhibition of angiogenesis and invasion by 3,3'-diindolylmethane is mediated by the nuclear factor-kappaB downstream target genes MMP-9 and uPA that regulated bioavailability of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res* 67: 3310-3319.
- Koyama H, Nishizawa Y, Hosoi M, Fukumoto S, Kogawa K, Shioi A, Morii H (1996) The fumagillin analogue TNP-470 inhibits DNA synthesis of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-I. Possible involvement of cyclin-dependent kinase 2. *Circ Res* 79: 757-764.
- Krieg M, Nass R, Tunn S (1993) Effect of aging on endogenous level of 5 alpha-dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, and estrone in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 375-381.
- Krtolica A, Campisi J (2002) Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1401-1414.
- Lau KM, Tam NN, Thompson C, Cheng RY, Leung YK, Ho SM (2003) Age-associated changes in histology and gene-expression profile in the rat ventral prostate. *Lab Invest* 83: 743-757.
- London CA, Sekhon HS, Arora V, Stein DA, Iversen PL, Devi GR (2003) A novel antisense inhibitor of MMP-9 attenuates angiogenesis, human prostate cancer cell invasion and tumorigenicity. *Cancer Res Ther* 10: 823-832.
- Lynch CC, Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 70: 561-573.
- Mañes S, Llorente M, Lacalle RA, Gómez-Moutón C, Kremer L, Mira E, Martínez-A C (1999) The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J Biol Chem* 274: 6935-6945.
- Matsusaka S, Nakasho K, Terada N, Sugihara A, Tsujimura T, Takanashi T, Uematsu K, Okamoto E, Toyosaka A (2000) Inhibition by an angiogenesis inhibitor, TNP-470, of the growth of a human hepatoblastoma heterotransplanted into nude mice. *J Pediatr Surg* 35: 1198-1204.
- Miele C, Rochford JJ, Filippa N, Giorgetti-Peraldi S, Van Obberghen E (2000) Insulin and insulin-like growth factor-I induce vascular endothelial growth factor mRNA expression via different signaling pathways. *J Biol Chem* 275: 21695-21702.
- Miller MI, Puchner PJ (1998) Effects of finasteride on hematuria associated with benign prostate hyperplasia: long-term follow-up. *Urology* 51: 237-240.
- Minischetti M, Vacca A, Ribatti D, Iurlaro M, Ria R, Pellegrino A, Gasparini G, Dammacco AF (2000) TNP-470 and recombinant human interferon-alpha2a inhibit angiogenesis synergistically. *Br J Haematol* 109: 829-837.
- Montgomery DC (1991). *Design and Analysis of Experiments*. Third ed. John Wiley & Sons, New York.
- Montico F, Hetzl AC, Cândido EM, Fávaro WJ, Cagnon VH (2011) Hormonal therapy in the senescence: Prostatic microenvironment structure and adhesion molecules. *Micron* 42: 642-655.
- Morrissey C, Buser A, Scolaro J, O'Sullivan J, Moquin A, Tenniswood M (2002) Changes in hormone sensitivity in the ventral prostate of aging Sprague-Dawley rats. *J Androl* 23: 341-351.
- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR (1999) Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 59: 5002-5011.
- Pandini G, Genua M, Frasca F, Vigneri R, Belfiore A (2009) Sex steroids upregulate the IGF-1R in prostate cancer cells through a nongenotropic pathway. *Ann N Y Acad Sci* 1155: 263-267.
- Pareek G, Shevchuk M, Armenakas NA, Vasjovic L, Hochberg DA, Basillote JB, Fracchia JA (2003) The effect of finasteride on the expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density: a possible mechanism for decreased prostatic bleeding in treated patients. *J Urol* 169: 20-23.

- Plymate SR, Tennant MK, Culp SH, Woodke L, Marcelli M, Colman I, Nelson PS, Carroll JM, Roberts CT Jr, Ware JL (2004) Androgen receptor (AR) expression in AR-negative prostate cancer cells results in differential effects of DHT and IGF-1 on proliferation and AR activity between localized and metastatic tumors. *Prostate* 61: 276-290.
- Prahalada S, Rhodes L, Grossman SJ, Heggan D, Keenan KP, Cukierski MA, Hoe CM, Berman C, Van Zwieten MJ (1998) Morphological and hormonal changes in the ventral and dorsolateral prostatic lobes of rats treated with finasteride, a 5-alpha reductase inhibitor. *Prostate* 3: 157-164.
- Prins GS, Jung MH, Vellanoweth RL, Chatterjee B, Roy AK (1996) Age-dependent expression of the androgen receptor gene in the prostate and its implication in glandular differentiation and hyperplasia. *Dev Genet* 18: 99-106.
- Retter AS, Figg WD, Dahut WL (2003) The combination of antiangiogenic and cytotoxic agents in the treatment of prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* 2: 153-159.
- Reynolds AR, Kyprianou N (2006) Growth factor signalling in prostatic growth: significance in tumour development and therapeutic targeting. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 2: S144-152.
- Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkord J, Cohen MB (2004) Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer* 11: 225-254.
- Rullis I, Shaeffer JA, Lilien OM (1975) Incidence of prostatic carcinoma in the elderly. *Urology* 6: 295-297.
- Ryan CJ, Haqq CM, Simko J, Nonaka DF, Chan JM, Weinberg V, Small EJ, Goldfine ID (2007) Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in local and metastatic prostate cancer. *Urol Oncol* 25: 134-140.
- Saikali Z, Setya H, Singh G, Persad S (2008) Role of IGF-1/IGF-1R in regulation of invasion in DU145 prostate cancer cells. *Cancer Cell Int* 8: 10.
- Sin N, Meng L, Wang MQ, Wen JJ, Bornmann WG, Crews CM (1997) The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6099-6103.
- Sprenger CC, Plymate SR, Reed MJ (2008) Extracellular influences on tumour angiogenesis in the aged host. *Br J Cancer* 98: 250-255.
- Strieth S, Eichhorn ME, Sutter A, Jonczyk A, Berghaus A, Dellian M (2006) Antiangiogenic combination tumor therapy blocking alpha(v)-integrins and VEGF-receptor-2 increases therapeutic effects in vivo. *Int J Cancer* 119: 423-431.
- Sweeney P, Karashima T, Kim SJ, Kedar D, Mian B, Huang S, Baker C, Fan Z, Hicklin DJ, Pettaway CA, Dinney CP (2002) Anti-vascular endothelial growth factor receptor 2 antibody reduces tumorigenicity and metastasis in orthotopic prostate cancer xenografts via induction of endothelial cell apoptosis and reduction of endothelial cell matrix metalloproteinase type 9 production. *Clin Cancer Res* 8: 2714-2724.
- Takamoto T, Sasaki M, Kuno T, Tamaki N (2001) Flk-1 specific kinase inhibitor (SU5416) inhibited the growth of GS-9L glioma in rat brain and prolonged the survival. *Kobe J Med Sci* 47: 181-191.
- Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Miller GJ, Ford LG, Lieber MM, Cespedes RD, Atkins JN, Lippman SM, Carlin SM, Ryan A, Szczepanek CM, Crowley JJ, Coltman CA Jr (2003) The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N Engl J Med* 349: 215-224.
- Thum T, Hoerber S, Froese S, Klink I, Stichtenoth D, Galuppo P, Jakob M, Tsikas D, Anker S, Poole-Wilson P, Borlak J, Ertl G, Bauersachs J (2007) Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth hormone mediated increase of insulin-like growth factor-1. *Circ Res* 100: 434-443.
- Tsukamoto S, Akaza H, Imada S, Koiso K, Shirai T, Ideyama Y, Kudo M (1995) Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by use of finasteride or Casodex. *J Natl Cancer Inst* 87: 842-843.
- Turk BE, Griffith EC, Wolf S, Biemann K, Chang YH, Liu JO (1999) Selective inhibition of amino-terminal methionine processing by TNP-470 and ovalicin in endothelial cells. *Chem Biol* 6: 823-833.
- Tutrone RF Jr, Ball RA, Ornitz DM, Leder P, Richie JP (1993) Benign prostatic hyperplasia in a transgenic mouse: a new hormonally sensitive investigatory model. *J Urol* 149: 633-699.

- Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR (2001) Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* 166: 2472-2483.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR (2002) Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res* 8: 2912-2923.
- Van Moorselaar RJ, Voest EE (2002) Angiogenesis in prostate cancer: its role in disease progression and possible therapeutic approaches. *Mol Cell Endocrinol* 197: 239-250.
- Wang YZ, Wong YC (1998) Sex hormone-induced prostatic carcinogenesis in the Noble rat: the role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the development of prostate cancer. *Prostate* 35: 165-177.
- Yoshiji H, Harris SR, Thorgeirsson UP (1997) Vascular endothelial growth factor is essential for initial but not continued *in vivo* growth of human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 57: 3924–3928.
- Zar JH (1999) *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall Upper, New Jersey.





## 5. ARTIGO CIENTÍFICO II

**“Prostatic angiogenesis stimulation during senescence resembles cancer progression in TRAMP mice and can be inhibited by antiangiogenic therapy”**

Fabio Montico<sup>1</sup>; Larissa Akemi Kido<sup>1</sup>; Amanda Cia Hetzl<sup>1</sup>; Raísa Mistieri Lorencini<sup>1</sup>; Valéria Helena Alves Cagnon<sup>1</sup>.

**Artigo a ser submetido ao periódico *Angiogenesis*.**

1- Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, 13083-865, Campinas, São Paulo, Brazil.

Correspondence to: Valéria H. A. Cagnon PhD, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, 13083-865, Campinas, São Paulo, Brazil. Telephone: (+55) (19) 3521-6103. Fax: (+55) (19) 3289-3124. E-mail: quitete@unicamp.br.

## 5.1. ABSTRACT

Angiogenesis is a fundamental process for tumor growth and its inhibition represents a promising therapeutic approach in cancer treatment. Prostate cancer is the most common malignant disease in men and is directly associated to the changes which occur in the organ during senescence. Thus, the aim herewith was to characterize angiogenic responses in elderly mice prostate, comparing them to the glandular microenvironment associated to cancer progression in the TRAMP model. Furthermore, we intended to analyze the effects of antiangiogenic and/or hormonal ablation therapies during this life period. Male elderly mice (52 week-old FVB) were submitted to antiangiogenic treatments with SU5416 (6 mg/kg; i.p.) and/or TNP-470 (15 mg/kg; s.c.). Hormonal blockage as achieved by means of finasteride administration (20 mg/kg; s.c.), alone or in association to both inhibitors. Dorsolateral prostate samples were harvested for immunohistochemical and Western Blotting analyses of VEGF, HIF-1 $\alpha$ , FGF-2, and endostatin. Angiogenesis was evaluated by means of CD31 positive microvessel density (MVD). Senescence led to VEGF, HIF-1 $\alpha$  and FGF-2 increase as well as raised MVD in the prostatic microenvironment, in a similar way to the observations in the TRAMP model. Antiangiogenic and/or finasteride treatments resulted in decreased VEGF and HIF-1 $\alpha$  levels, especially following TNP-470 administration, either alone or associated to SU5416. Moreover, the combination of these agents resulted in raised endostatin levels, as well as in the senile control animals, regardless of finasteride presence. On the other hand, FGF-2 diminution after TNP-470 and hormonal ablation therapies was not so evident. Despite this observation, MVD was significantly decreased in all treated groups. Thus, we concluded that senescence generated a pro-angiogenic microenvironment similar to the observed during cancer progression in TRAMP mice, which certainly favored the development of neoplastic lesions during this life period. The combined therapy with SU5416 and TNP-470 was more efficient than each treatment by itself, since it led to enhanced imbalance towards angiogenic inhibition in the organ. Finally, the maintenance of high FGF-2 levels after some of the treatments studied deserves attention, considering the potential involvement of this molecule in resistance induction pathways.

**Keywords:** Prostate, senescence, TRAMP, angiogenesis, SU5416, TNP-470.

## 5.2. INTRODUCTION

Angiogenesis is a complex multi step process leading to new blood vessel formation from pre-existing capillaries. It is regulated by the relative balance between inducers and inhibitors in the tissue microenvironment and involves interactions among endothelial cells, extracellular matrix (ECM) and different soluble factors (Liekens *et al.*, 2001; van Moorselaar & Voest, 2002). Despite being restricted in adults, angiogenesis is stimulated during cancer to supply the demand of oxygen and nutrients required for tumor growth (Doll *et al.*, 2001; Liekens *et al.*, 2001; van Moorselaar & Voest, 2002). Thus, the mechanisms which usually keep the quiescent vasculature are deregulated in tumors, leading to decreased levels of angiogenic inhibitors, increase of the inducers or even a combination of both events in the extracellular microenvironment (Doll *et al.*, 2001; Liekens *et al.*, 2001; Huss *et al.*, 2003a).

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblastic growth factor-2 (FGF-2) are among the main angiogenic factors involved in prostate cancer progression and metastasis development (van Moorselaar & Voest, 2002; Mukherji *et al.*, 2013). VEGF is one of the most important pro-angiogenic factors and it is able to stimulate the proliferation, migration and tube formation by endothelial cells, apart from increasing vascular permeability, which is an important factor for angiogenesis initiation (Liekens *et al.*, 2001; van Moorselaar & Voest, 2002). VEGF signaling transduction occurs by means of two tyrosine kinase receptors located in the endothelial cell membrane, VEGFR1 (Flt-1) and VEGFR2 (Flk-1/KDR), the latter being the major mediator of VEGF actions (van Moorselaar & Voest, 2002; Reynolds & Kyprianou, 2006). Although low VEGF levels were verified in the healthy prostate, this pro-angiogenic factor was increased in pathological conditions, such as prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and prostate cancer (Doll *et al.*, 2001; Soultziz *et al.*, 2006; Gonzalez-Moreno *et al.*, 2010). VEGF synthesis and secretion is induced by the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), a heterodimeric transcription factor consisting of the subunits HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$ , which is produced by cells in response to low oxygen tension (Huss *et al.*, 2001; van Moorselaar & Voest, 2002; Berger *et al.*, 2003; Kimbro & Simons, 2006). Under hypoxic conditions, the HIF-1 $\alpha$  is stabilized, protected from degradation and translocated to the cell nucleus, where it dimerizes with HIF-1 $\beta$  and activates the expression of several hypoxia-response genes, namely angiogenic factors such as VEGF and FGF-2 (Huss *et al.*, 2001; Berger *et al.*, 2003; Macpherson *et al.*, 2003; Kimbro & Simons, 2006; Mabeesh & Amir, 2007). It is known that FGF-2 is involved in tumor angiogenesis, including in the prostate, showing increased expression not only in

neoplastic cells but also in the tumor stroma (Kwabi-Addo *et al.*, 2004). In addition, different authors showed a narrow association between increased FGF-2 expression in tumor cells and prostate cancer progression towards undifferentiated and metastatic stages (Cronauer *et al.*, 1997; Doll *et al.*, 2001; Huss *et al.*, 2003a; Kwabi-Addo *et al.*, 2004).

The various steps of angiogenesis present several potential targets to therapeutic intervention and two classes of angiogenic inhibitors have been described according to their mechanism of action: direct and indirect inhibitors (Folkman & Hlatky, 1998; Liekens *et al.*, 2001; Retter *et al.*, 2003). The indirect agents inhibit the production or release of pro-angiogenic factors and can also interfere in their interaction with the corresponding receptors in the endothelial cells (Folkman & Hlatky, 1998; Liekens *et al.*, 2001). SU5416 is an example of indirect inhibitor whose action occurs by selective inhibition of the VEGF-induced VEGFR2 phosphorylation, displaying powerful antiangiogenic and antitumor activities against a variety of tumor xenografts implanted into immunodeficient mice, including prostatic adenocarcinoma (Fong *et al.*, 1999; Liekens *et al.*, 2001). On the other hand, the direct antiangiogenic agents act by inhibiting the proliferation and migration of activated endothelial cells, and also leading them to undergo apoptosis (O'Reilly *et al.*, 1997; Matsusaka *et al.*, 2000; Liekens *et al.*, 2001). TNP-470 is a synthetic derivative of the antibiotic fumagillin and performs its direct action through the inhibition of the methionin aminopeptidase enzyme (MetAP-2), resulting in interruption of the endothelial cell cycle (Sin *et al.*, 1997; Castronovo & Belotti, 1996; Turk *et al.*, 1999; Liekens *et al.*, 2001; Figg *et al.* 2002). Besides the synthetic antiangiogenic agents, endogenous direct inhibitors, such as endostatin, which is a C-terminal fragment of collagen XVIII produced by proteolytic cleavage, also have powerful antitumoral effects (O'Reilly *et al.*, 1997; Macpherson *et al.*, 2003). Thus, antiangiogenic therapy has been considered as an efficient strategy for the treatment of several tumor types, however, its influence on prostate cancer is not yet well established (Mukherji *et al.*, 2013). Furthermore, considering the androgenic dependency of the gland for angiogenesis induction, hormonal blockers such as finasteride have also been used in the treatment of prostatic lesions (Franck-Lissbrant *et al.*, 1998; Miller & Puchner, 1998; Foley & Bailey, 2000).

Senescence is associated with significant hormonal changes in the prostate, characterized by progressive estradiol accumulation and simultaneous decrease of androgen levels as well as reduced prostatic sensitivity to the androgenic actions (Banerjee *et al.*, 1998; Banerjee *et al.*, 2000; Banerjee *et al.*, 2001). In parallel, senescent

cells accumulate in the prostatic stroma, secreting higher levels of harmful factors to the tissue structure and function, such as inflammatory cytokines, growth factors, ECM components and proteases (Krtolica & Campisi, 2002; Sprenger *et al.*, 2008). Such alterations create a permissive microenvironment for the development of prostate adenocarcinoma, which represents the most common neoplastic disease and the second leading cause of cancer-related deaths in western men (Krtolica & Campisi, 2002; van Moorselaar & Voest, 2002; Sprenger *et al.*, 2008; Mukherji *et al.*, 2013).

Thus, the aim herewith was to characterize the angiogenic responses in the prostate during senescence, comparing them to the microenvironment associated to prostatic lesions in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model. Also, we intended to analyze antiangiogenic therapy influences in the prostatic biology during late life.

### **5.3. MATERIALS AND METHODS**

#### **5.3.1. Animals and experimental procedures**

A total of 56 male FVB mice and 16 male transgenic TRAMP mice (C57BL/6-Tg(TRAMP)8247Ng/J X FVB/NJ)F1/J) were used in this study. The TRAMP model develops tumors which resemble many features of human clinical disease (Greenberg *et al.*, 1995; Gingrich *et al.*, 1999). These mice show PIN lesions as early as 6 week-old and between 18 and 24 weeks all mice present primary tumors and metastasis to other organs (Greenberg *et al.*, 1995; Gingrich *et al.*, 1999). The animals were provided by the Multidisciplinary Center for Biological Investigation on Laboratory Animal Science (CEMIB) at the University of Campinas (Unicamp) and divided into nine groups. Control groups were as follows: Young Control (YNG) (18 week-old FVB mice), Prostatic Intraepithelial Neoplasia Control (PIN) (8 week-old TRAMP mice) and Cancer Control (PC) (18-week-old TRAMP mice). Experimental groups were composed by 52-week-old FVB mice submitted to the following treatments: Senile Group (SEN): received the same treatment as controls; SU5416 Group (SU): 6 mg/kg SU5416 (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, USA) diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) (i.p.) (altered Strieth *et al.* 2006; Montico *et al.*, 2014); TNP-470 Group (TNP): 15 mg/kg TNP-470 (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, USA) diluted in DMSO (s.c.) (altered Matsusaka *et al.* 2000; Montico *et al.*, 2014); SU5416 + TNP-470 Group (ST): received the same treatments as SU and TNP groups; Finasteride Group (FIN): 20 mg/kg finasteride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in DMSO (s.c.)

(altered Tutrone et al. 1993; altered Gonzales et al. 2008; Montico *et al.*, 2014); SU5416 + TNP-470 + Finasteride Group (STF): received the same treatments as SU, TNP and FIN groups.

All mice received water and solid diet *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brazil). After 21 days of treatment every other day, the animals were weighed on a Marte AS 5500 semi-analytical scale (São Paulo, Brazil), anesthetized with 2% xylazine hydrochloride (5 mg/kg; König, São Paulo, Brazil) and 10% ketamine hydrochloride (60 mg/kg; Fort Dodge, Iowa, USA) and euthanized. Samples from the dorsolateral prostate were collected and processed for immunohistochemical and Western Blotting analyses.

This study was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (University of Campinas - Unicamp, protocol nº. 2386-1) and the experiments were carried out in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA).

### **5.3.2. Immunohistochemistry**

Samples of the dorsolateral prostate were collected from four animals in each group and fixed in Bouin's solution for 24 hours. After fixation, the tissues were washed in 70% ethanol, dehydrated in an increasing ethanol series, diaphanized in xylene for 2 hours and subsequently embedded in Paraplast (Paraplast Plus, St. Louis, USA). The materials were then cut into 5 µm thick sections using a microtome (Zeiss Hyrax M60) and the sections were deparaffinized in xylene, hydrated in a decreasing alcohol series and rinsed under distilled water. Antigens were retrieved by boiling the sections in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) three times for 5 min in a microwave oven. After that, the sections were incubated in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3% in methanol) for 15 min to block endogenous peroxidase. Nonspecific binding was blocked by incubating the sections in a blocking solution (3% BSA in TBS-T buffer) for 1h at room temperature. The VEGF, HIF-1α, FGF-2 and endostatin antigens were detected, respectively, using the following antibodies: mouse monoclonal anti-VEGF (sc-53462) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA), mouse monoclonal anti-HIF-1α (ab113642) (Abcam, USA), rabbit polyclonal anti-FGF-2 (sc-79) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA), mouse monoclonal anti-endostatin (ab64569) (Abcam, USA) and polyclonal rabbit anti-CD31 (sc-1506-R) (Santa Cruz Biotechnology, USA). Primary antibodies were diluted in 1% BSA (1:35 – 1:100) and applied to the sections overnight at 4°C. The sections were then washed three times for 5 min with TBS-T and subsequently incubated in HRP-conjugated secondary antibodies for

2h at room temperature. The secondary antibodies used were goat anti-mouse IgG (W4021) (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) and goat anti-rabbit IgG (W4018) (Promega Corporation, Madison, WI, USA). After washing in TBS-T, peroxidase activity was detected using a diaminobenzidine (DAB) chromogen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 min. Sections were lightly counterstained with Harris Hematoxylin, dehydrated in an increasing ethanol series and xylene, mounted in Entellan (Merck, Darmstadt, Germany) and photographed in the photomicroscope (Nikon Eclipse E-400). Sections from the dorsolateral prostate that were not stained with primary antibody were used as negative controls. The DAB precipitate, which indicates positive antibody reaction, was evaluated in prostate sections from four animals per group. The distribution of immunoreactivities was graded on a 0-3 scale, according to the percentage of positive areas for each antigen in ten microscopic fields under 400X magnification: 0 (absent) = 0%; 1 (weak) = 1-33%; 2 (moderate) = 34-66%; and 3 (intense) = more than 66% (altered Tuxhorn *et al.* 2002a).

### **5.3.3. Western Blotting**

Dorsolateral prostate samples from four animals in each experimental group were collected and frozen in liquid nitrogen. The samples were weighed and homogenized in a Polytron homogenizer (Kinematica Inc., Lucerne, Switzerland) for 1 min in a 50 µL/mg RIPA lysis buffer (Millipore, Temecula, California, USA). The tissue homogenates were centrifuged at 14000 rpm for 20 min at 4°C and a sample of each extract was used for protein quantification with Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). The supernatants were mixed (1:1) with 3X Laemmli buffer and transferred to a dry bath at 100°C for 5 min. Aliquots containing 75 µg of protein were separated by electrophoresis in SDS-PAGE gels under reducing conditions. After electrophoresis, proteins were transferred to Hybond-ECL nitrocellulose membranes (Amersham, Pharmacia Biotech, Arlington Heights, USA) at 70V for 3h. The membranes were blocked with 3% BSA in TBS-T for 60 min and incubated at 4°C overnight with the following primary antibodies in a dilution range of 1:350-1:500 in 1% BSA: mouse monoclonal anti-VEGF (sc-53462) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA), mouse monoclonal anti-HIF-1α (ab113642) (Abcam, USA), rabbit polyclonal anti-FGF-2 (ab106245) (Abcam, USA) and mouse monoclonal anti-endostatin (ab64569) (Abcam, USA).

The membranes were then incubated for 2h with the same HRP-conjugated secondary antibodies utilized for immunostaining diluted in a 1:5000-1:10000 dilution

range. After washing in TBS-T, peroxidase activity was detected through the incubation of the membranes in the chemiluminescent solution (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) for 5 min, followed by fluorescence capture using the Gene Gnome equipment and the Gene Sys image acquisition software (Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK).  $\beta$ -actin mouse monoclonal ACTBD11B7 (sc-81178) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) antibody was used as an endogen control for comparison among groups. The intensity of antigen bands in each experimental group was determined by densitometry using the *Image J (Image Analysis and Processing in Java)* software for image analyses and was expressed as the mean percentage in relation to  $\beta$ -Actin band intensity.

#### **5.3.4. Microvessel density (MVD) analysis**

Microvessel density determination was performed by counting the number of CD31 positive blood vessels in four animals per experimental group. For this purpose, eight random and nonoverlapping fields were defined for each animal under 400X magnification. The fields were photographed in the photomicroscope (Nikon Eclipse E-400) using the *Nis-Elements: Advanced Research* (USA) software and subsequently submitted to CD31 positive vessels count following the criteria proposed by Weidner *et al.* (1993). Microvessel density was expressed as the mean value obtained from the eight fields in each animal and also as the maximum density in a particular field (Hochberg *et al.*, 2002).

#### **5.3.5. Statistical analysis**

The comparative statistical analysis of VEGF, HIF-1 $\alpha$ , FGF-2 and endostatin protein levels as well as mean and maximum MVD among the different experimental groups was carried out by analysis of variance (ANOVA) and Tukey multiple range test, with the level of significance set at 5% (Montgomery, 1991; Zar, 1999). The results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation.



## 5.4. RESULTS

### 5.4.1. Immunohistochemistry and Western Blotting analyses

#### VEGF

VEGF immunoreactivity was more intense in the prostatic tissue of the PIN, CP and SEN groups in relation to the other experimental groups (Figs. 1B, 1C and 1D; Table 1). The antiangiogenic drugs led to decreased VEGF immunolabeling in both glandular compartments in relation to the SEN group, especially in the TNP and ST groups (Figs. 1E, 1F and 1G; Table 1). Despite showing less marked reduction than the latter groups, weaker VEGF reactivity in comparison to the SEN group was also verified in response to finasteride treatment, either alone or in association with the angiogenic inhibitors (Figs. 1H and 1I; Table 1). The Western blotting analysis followed the same pattern of the immunohistochemistry evaluation and VEGF protein levels found for the different groups are shown in the Figure 5.

#### HIF-1 $\alpha$

Intense HIF-1 $\alpha$  reactivity was detected in the epithelium of the PIN group, which was the only group to present scattered epithelial cells with preferential nuclear rather than cytoplasmic immunolabeling (Figs. 2B and 2C; Table 1). PC group characterized weaker localization, showing moderate HIF-1 $\alpha$  immunostaining in epithelial cell cytoplasm (Fig. 2D; Table 1). Considering the SEN group, increased reactivity was observed in relation to the young animals, with two immunolocalization patterns being described (Figs. 2E and 2F). While the areas showing healthy glandular morphology registered HIF-1 $\alpha$  staining both in epithelial cytoplasm and nuclei, portions of the gland with disorganized histoarchitecture were characterized by absence of reactivity in the epithelium together with intense stromal localization (Figs. 2E and 2F; Table 1). SU and TNP groups presented reactivity profiles showing weaker immunostaining in comparison to the SEN group, especially in the epithelial nuclei and stroma, respectively (Figs 2G and 2H; Table 1). Finasteride administration led to similar immunolabeling pattern as in the YNG group, whereas the combined treatments in the ST and STF groups resulted in absence of HIF-1 $\alpha$  localization in both glandular compartments (Fig. 2I and 2K; Table 1). Protein levels

measured by Western blotting recapitulated the findings of the immunohistochemical analysis (Fig. 5).

### **FGF-2**

While in the PIN group FGF-2 immunolabeling was increased only in the prostatic epithelium, in the CP and SEN groups this molecule showed intense reactivity in both glandular compartments (Fig. 3B, 3C and 3D; Table 1). SU5416 administration by itself, or associated with TNP-470 in the ST group, resulted in weaker FGF-2 immunostaining in relation to the SEN group (Fig. 3E and 3G; Table 1). On the other hand, in the TNP, FIN and STF groups the corresponding treatments led only to a slight decrease of the FGF-2 reactivity in the prostatic stroma (Fig. 3F, 3H and 3I; Table 1). As shown in Fig. 5, determination of FGF-2 protein levels by Western Blotting yielded conformable results.

### **Endostatin**

Endostatin immunoreactivity showed decline in the stromal compartment along the progression from preneoplastic to neoplastic prostatic lesions in the PIN and CP groups, respectively (Figs. 4B and 4C; Table 1). Intense epithelial and stromal immunolabeling was characterized in the SEN group, whereas the isolated treatments with SU5416, TNP-470 and mainly finasteride led to weaker reactivity for this antiangiogenic molecule (Figs. 4E, 4F and 4H; Table 1). In contrast, the combined treatments in the ST and STF groups were capable of restoring endostatin immunostaining intensity to a closer pattern relatively to that in the SEN group (Figs. 4G and 4I; Table 1). The endostatin protein levels determined by Western blotting were in accordance to the immunohistochemical findings, as shown in Figure 5.

#### **5.4.2. Microvessel density (MVD) analysis**

As shown in Figure 6, medium MVD was significantly higher in PIN, PC and SEN groups in relation to the other ones. There was no statistical difference among these groups (Figs. 6A-6J). Accordingly, maximum MVD was also raised, however, in this case there was significant difference between PC and SEN groups, whereas PIN group characterized an intermediate value (Fig. 6J). It is worth mentioning that the increased maximal MVD value registered for TRAMP mice in PIN and PC groups may be widely due

to the occurrence of intraepithelial microvessels, which were placed within epithelial clusters forming the several grades of prostatic lesions (Figs 6B and 6C).

## 5.5. DISCUSSION

In the present study, we demonstrated stimulated angiogenesis in elderly mice prostate as well as in TRAMP mice glandular lesions, as reflected by increased microvessel density. In agreement, higher levels of pro-angiogenic factors were registered in the PIN, PC and SEN groups. Nevertheless, in opposition to VEGF and FGF-2, HIF-1 $\alpha$  showed decline of its levels during TRAMP cancer progression from preneoplastic to neoplastic lesions. Antiangiogenic treatment was able to inhibit and/or reverse these senescence-associated stimuli to neovascularization. However, while VEGF and HIF-1 $\alpha$  were more responsive to TNP-470, FGF-2 showed increased sensitivity to SU5416. The association between both inhibitors led to cumulative, or at least similar, effects in relation to each isolated treatment. Finasteride administration resulted in decreased angiogenesis as well, reducing all the pro-angiogenic factors studied, especially HIF-1 $\alpha$ . Additionally, although the combination of finasteride and the antiangiogenic drugs also led to an impairment of the neovascularization, it is noteworthy that all pro-angiogenic factors were raised in the STF group relatively to the ST group, suggesting a possible positive effect of finasteride on their regulation.

Senescence is a life period in which the cellular capacity to produce angiogenic factors such as VEGF is impaired (Rivard *et al.*, 1999). Despite this fact, studies have shown that senescent fibroblasts *in vitro* expressed high VEGF levels, giving them greater capacity to stimulate *in vivo* xenograft tumor growth and vascularization (Coppé *et al.*, 2006). Thus, even though senescence is associated with reduced VEGF body levels, the accumulation of senescent cells in a specific organ, such as the prostate, can lead to increased expression of this factor in the tissue microenvironment, enhancing the risk for neoplastic development (Sprenger *et al.*, 2008). Similarly, growth factor expression analysis in the elderly rodent prostate showed a two-fold increase in FGF-2 levels as a function of age, indicating the possible influence of this molecule, acting synergistically with other factors, in the raised epithelial cell proliferation during this life period (Slater *et al.*, 2000).

Recruiting new blood vessels is a primordial condition for tumor development, considering that, as the tumor grows, the increasing distance between neoplastic cells and the preexistent vascular network leads to constant oxygen and nutrient deprivation (Huss

*et al.*, 2001; Liekens *et al.*, 2001; Macpherson *et al.*, 2003). Hypoxia represents the major stimulus for tumor angiogenesis initiation, the so-called “angiogenic switch”, which depends on the net balance between pro- and antiangiogenic factors in the tumor microenvironment (Liekens *et al.*, 2001). Different authors demonstrated the increased expression of pro-angiogenic factors in the prostate cancer, such as VEGF and FGF-2, which act synergistically to promote tumor angiogenesis in response to hypoxia and elevated HIF-1 $\alpha$  levels (Giri *et al.*, 1999; Doll *et al.*, 2001; Huss *et al.*, 2001; Berger *et al.*, 2003; Huss *et al.*, 2003a). Thus, a positive feedback loop is created, in which hypoxia stimulates pro-angiogenic factor synthesis, leading to neovascularization and enhanced tumor growth, which ultimately generates a microenvironment with oxygen shortage (Macpherson *et al.*, 2003).

The activation of pro-angiogenic factor expression, such as VEGF, HIF-1 $\alpha$  and FGF-2, is an early event during prostatic carcinogenesis, preceding the emergence of malignant lesions (Wang & Wong, 1998; Huss *et al.*, 2001; Huss *et al.*, 2003a; Zhong *et al.*, 2004). According to Wang & Wong (1998), the VEGF produced by premalignant epithelial cells and smooth muscle cells associated to blood vessels could have a paracrine action on the vascular endothelium, promoting the angiogenesis required for the progression of PIN lesions towards prostate cancer. Furthermore, VEGF can also modulate important non-angiogenic events during PIN-to-adenocarcinoma transition, acting in an autocrine way to induce epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) on the PIN cells. As a result, these cells lose adhesion to the basement membrane and acquire increased migratory capacity, which eventually favors invasion in the early steps of carcinogenesis (Gonzalez-Moreno *et al.*, 2010). On the other hand, in a study concerning the expression profile of VEGF signaling molecules during cancer progression in TRAMP mice, Huss *et al.* (2001) verified that this factor did not show an important role in the initiation of prostatic tumorigenesis. Moreover, these authors also registered the existence of two distinct angiogenic events during prostate cancer progression in this animal model (Huss *et al.*, 2001), which were also ascertained in our study. The first event, an early “initiation angiogenic switch”, was characterized by the occurrence of intraepithelial neovascularization in high-grade PIN lesions with simultaneous increase of HIF-1 $\alpha$  and VEGFR1 expression (Huss *et al.*, 2001). The second event corresponds to the transition between well- and poor-differentiated adenocarcinoma stages, reason why it is called “progression angiogenic switch”, and is characterized by decreased VEGFR1 and HIF-1 $\alpha$ , raised VEGF and VEGFR2 expression as well as elevated intraepithelial microvessel

density (Huss *et al.*, 2001). Finally, these authors verified FGF-2 overexpression in PIN lesions concomitantly with the “initiation angiogenic switch”, suggesting this molecule as responsible for angiogenesis initiation in the TRAMP model (Huss *et al.*, 2003a).

Several studies have demonstrated that SU5416 administration resulted in VEGF signaling inhibition, inducing endothelial cell apoptosis, reducing microvessel density and delaying the progression of different tumor types, including in the TRAMP model (Fong *et al.*, 1999; Huss *et al.*, 2003b). However, considering that SU5416 is a specific VEGFR2 inhibitor, the antitumor effects of this drug in TRAMP mice were observed only when the treatment was initiated after the progression angiogenic switch (Huss *et al.*, 2003b). Thus, the authors verified that SU5416 administration was not able to delay prostate cancer progression in these animals when initiated at the first steps of tumorigenesis, a period in which FGF-2 signaling pathways preponderate in the tumor milieu (Huss *et al.*, 2003a; Huss *et al.*, 2003b). In this sense, it is important to consider that the indirect angiogenic inhibition is specific, possibly enabling the tumor to overcome this inhibitory effect by switching to the production of another angiogenic factor, since its genetic instability allows the synthesis of different pro-angiogenic molecules during its development (Yoshiji *et al.*, 1997; Doll *et al.*, 2001; Liekens *et al.*, 2001; Abdollahi *et al.*, 2003). Thus, the inhibition of a single factor may lead only to partial control of the tumor growth and the combination of antiangiogenic agents with different action mechanisms is required to achieve more satisfactory results (Liekens *et al.*, 2001; Abdollahi *et al.*, 2003). Indeed, the association between direct and indirect inhibitors, such as endostatin and SU5416, resulted in synergistic antiangiogenic effects both in endothelial cells *in vitro* as well as in tumor xenografts *in vivo*, enhancing the antitumor activity of these agents (Abdollahi *et al.*, 2003). Similarly to endostatin, TNP-470 represents a direct antiangiogenic drug whose action is wider in relation to SU5416 and occurs by suppressing the activation of regulatory molecules in several cell cycle steps, thus preventing endothelial proliferation (Abe *et al.*, 1994; Sin *et al.*, 1997; Castronovo & Belotti, 1996; Turk *et al.*, 1999; Figg *et al.*, 2002). In addition, TNP-470 also showed inhibitory effect on the *in vitro* endothelial responses to pro-angiogenic stimuli such as FGF-2 and VEGF, apart from being able to compete with FGF-2 for its binding sites on the heparan sulfate molecules in the ECM (Yoshida *et al.*, 1996; Bond *et al.*, 2000). Considering that these molecules create an extracellular reservoir of FGF-2, which increases its half-life and protect it from degradation (Cronauer *et al.*, 2003), the unavailability to bind them may represent one possible mechanism by which TNP-470 action antagonizes FGF-2 pro-angiogenic effects.

VEGF production is modulated by androgens both in normal and neoplastic prostate and its expression is mediated by the androgen receptor (AR), which is capable of regulate the balance between vascular stability and angiogenesis in the organ (Joseph *et al.*, 1997; Montecinos *et al.*, 2012). As other cell types in the prostate, endothelial cells also express AR and, thus, androgens are responsible to modulate the integrity, viability and proliferative potential of these cells (Montecinos *et al.*, 2012). Such regulation may occur both directly, through the interaction between these hormones and the AR, or indirectly, by means of paracrine signals which stimulate VEGF release in the stroma (Montecinos *et al.*, 2012). One of the indirect signals capable of mediating androgenic actions on the prostatic vasculature by interfering with VEGF signaling is HIF-1 $\alpha$ , whose expression is upregulated by androgens and inhibited by the lack of these hormones (Rudolfsson & Bergh, 2008; Al-Ubaidi *et al.*, 2012). Thus, any disturbance of the androgenic signaling in the prostatic microenvironment can lead to altered endothelial homeostasis and angiogenesis (Montecinos *et al.*, 2012). In the present study, the androgen ablation by means of finasteride treatment represents one of these disturbances, having led to decreased VEGF and HIF-1 $\alpha$  levels as well as reduced angiogenesis in the prostate of FIN and STF groups. In agreement, several studies conducted in hyperplastic prostatic tissue registered that finasteride induced reduction of MVD and VEGF expression (Häggström *et al.*, 2002; Pareek *et al.*, 2003). Despite this fact, it is known that pro-angiogenic factor expression, namely VEGF and FGF-2, can be stimulated by finasteride via TGF- $\beta$  signaling activation, which represents another stimulatory factor to neovascularization (Tuxhorn *et al.*, 2002b; Soultzis *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2010; van Meeteren & ten Dijke, 2012). In this way, we suggest that the slight VEGF increase in the STF group relatively to the ST group as well as the maintenance of increased FGF-2 expression in the finasteride-treated groups could be related with TGF- $\beta$  signaling stimulation. In addition, different authors registered the capacity of FGF-2 to induce resistance against anticancer agents in endothelial and prostatic tumor cells (Song *et al.*, 2000; Kwabi-Addo *et al.*, 2004), pointing the great relevance of the low-extent inhibition provided by some of the drugs used in this study.

Our results demonstrated increased endostatin in senescence whereas during the progression of glandular lesions in TRAMP mice this antiangiogenic molecule showed a biphasic response, characterized by raised levels in PIN lesions and subsequent reduction at the cancer phase. Decreased endostatin expression was also detected following the isolated treatments with SU5416, TNP-470 or finasteride. Nevertheless, the combination of

the direct and indirect angiogenic inhibitors resulted in endostatin levels closer to those verified in senescence, regardless of whether they were associated with finasteride or not.

Endostatin is a powerful antitumoral agent which is able to specifically suppress endothelial cell proliferation, increasing up to sevenfold the apoptosis rate in several tumor types (Boehm *et al.*, 1997; O'Reilly *et al.*, 1997; Liekens *et al.*, 2001). In general, it is suggested that endostatin antiproliferative activity occurs through the binding to cell surface molecules, leading to the production of intracellular pro-apoptotic signals and inhibition of genes involved in the synthesis of ECM-degrading proteases, such as MMPs (Macpherson *et al.*, 2003). According to Tilki *et al.* (2008), high endostatin expression in the male reproductive system could have protective role against tumor development. On the other hand, studies concerning endostatin expression in the prostate during senescence and its relation with neoplastic diseases in this organ are scarce. It is well known, however, that many malignant tumors are able to produce either angiogenic inhibitors or stimulators, and the latter, such as VEGF and FGF-2, can accumulate even in the excess of inhibitors in the tumor microenvironment (O'Reilly *et al.*, 1997; Folkman, 2006). Additionally, endostatin generation from collagen XVIII has been attributed to MMP proteolytic activity, which is increased along with MMP expression both in senescence and cancer (Tuxhorn *et al.*, 2001; Figg *et al.*, 2002; Lynch & Matrisian, 2002; Sprenger *et al.*, 2008; Montico *et al.*, 2014). In agreement, the results herewith also demonstrated raise of both pro and antiangiogenic molecules in prostate adenocarcinoma foci during advanced age. According to Macpherson *et al.* (2003), the simultaneous accumulation of endostatin and pro-angiogenic molecules, for instance HIF-1 $\alpha$  and VEGF, suggest that its inhibitory effects on angiogenesis may be independent of HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling. Indeed, these authors verified that endostatin treatment did not lead to diminished HIF-1 $\alpha$  and VEGF levels in endothelial and prostatic tumor cells, even though it resulted in modified VEGF subcellular localization, suggesting a possible mechanism of intracellular sequestration and inhibition of its secretion (Macpherson *et al.*, 2003). Moreover, it is known that endostatin can inhibit the phosphorylation of molecules involved in signaling transduction cascades from VEGF and FGF-2 receptors towards the intracellular medium (Sim *et al.*, 2000).

In our study, endostatin was responsive to the combined treatment with the angiogenic inhibitors SU5416 and TNP-470, even though there is no evidence in the literature about a direct action of these drugs on the endogenous expression of this molecule, neither about its expression profile during prostatic lesion progression in TRAMP

mice. According to Isayeva *et al.* (2007), prolonged systemic endostatin expression delayed tumor progression and increased the survival in the TRAMP model, but only if initiated before or during the “early angiogenic switch”, which precedes the occurrence of metastasis and the significant increase on VEGF levels. Afterwards, the same authors demonstrated that prostatic cells with high AR expression were more sensitive to long-term treatment with endostatin, indicating the ability of this molecule to delay the metastasis emergence in TRAMP mice by means of its action on multiple pathways involving the AR (Isayeva *et al.*, 2009). At the same time, it is known that TNP-470 is capable of upregulate androgen receptor gene expression, leading to increased AR protein levels in the intracellular environment (Horti *et al.*, 1999). Thus, taking into consideration the literature and our results, TNP-470 may positively regulate endostatin levels through intracellular signaling mechanisms involving the AR. Furthermore, these findings suggest that the low endostatin levels in the FIN group could reflect the androgen signaling imbalance in the prostate imposed by finasteride administration.

Based on our findings, we concluded that angiogenesis stimulation in the prostate during senescence certainly favored the development of pre-malignant and malignant lesions of this organ, considering the resemblance with the pro-angiogenic microenvironment observed during prostate cancer progression in TRAMP mice. On the other hand, we hypothesize that the raise of an angiogenic inhibitor in this life period may have resulted either from increased proteolytic activity or from a compensatory response of the prostate to inhibit the pro-angiogenic signaling activation. Antiangiogenic therapies were effective in promoting angiogenesis inhibition in the elderly mice prostate, especially upon the combination of direct and indirect inhibitors, which led to endostatin prevalence over the pro-angiogenic molecules in the organ. This finding is of great relevance in senescence, taking into consideration that an adverse microenvironment for angiogenesis can impair the progression of proliferative lesions which commonly occur in this period. Despite the angiogenesis impairment following finasteride treatment alone or associated to antiangiogenic drugs, our results suggest that the pro-angiogenic factors might also be secondarily upregulated by the hormonal ablation microenvironment resulting from finasteride treatment. In this sense, we concluded that the low extent of FGF-2 inhibition, especially upon the combination of the three treatments, must be looked carefully and suggests the necessity of new studies, considering the capacity of this growth factor to activate resistance induction pathways against the drugs studied.



## 5.6. APPENDICES

**Table 1.** Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF), hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ), fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and endostatin immunoreactivities in the dorsolateral prostate of mice of the experimental groups. Nu = nuclei; Cyt = cytoplasm.

Molecules	Glandular Compartments	Experimental Groups								
		YNG	PIN	PC	SEN	SU	TNP	ST	FIN	STF
VEGF	Epithelium	2	3	3	3	2	1	1	2	2
	Stroma	2	2	3	3	2	1	1	1	1
HIF-1 $\alpha$	Epithelium (Nu)	1	3	2	2 / 0	2	0	0	1	0
	Epithelium (Cyt)	0	2	0	1 / 0	0	0	0	0	0
	Stroma	0	0	0	0 / 3	0	1	0	0	0
FGF-2	Epithelium	2	3	3	3	2	3	2	3	3
	Stroma	2	1	3	3	2	2	2	2	2
Endostatin	Epithelium	1	1	1	3	1	2	2	1	3
	Stroma	1	3	1	3	1	1	3	1	2

**Figure 1.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) immunolabeling in the dorsolateral prostate of mice of the experimental groups. A) Young Control Group (YNG); B) PIN Control Group (PIN); C) Cancer Control Group (CP); D) Senile Group (SEN); E) SU5416 Group (SU); F) TNP-470 Group (TNP); G) SU5416 + TNP-470 Group (ST); H) Finasteride Group (FIN); I) SU5416 + TNP-470 + Finasteride Group (STF). Positive epithelial and stromal immunoreactivities are indicated as arrows and asterisks, respectively. Ep: epithelium; St: stroma; L: lumen.

**Figure 2.** Hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) immunolabeling in the dorsolateral prostate of mice the experimental groups. A) Young Control Group (YNG); B) and C) PIN Control Group (PIN); D) Cancer Control Group (CP); E) and F) Senile Group (SEN); G) SU5416 Group (SU); H) TNP-470 Group (TNP); I) SU5416 + TNP-470 Group (ST); J) Finasteride Group (FIN); K) SU5416 + TNP-470 + Finasteride Group (STF). Positive epithelial reactivities are indicated as arrows, black arrowheads or white arrowheads, according to the preferential immunolocalization of the antigen in the cell cytoplasm, nuclei

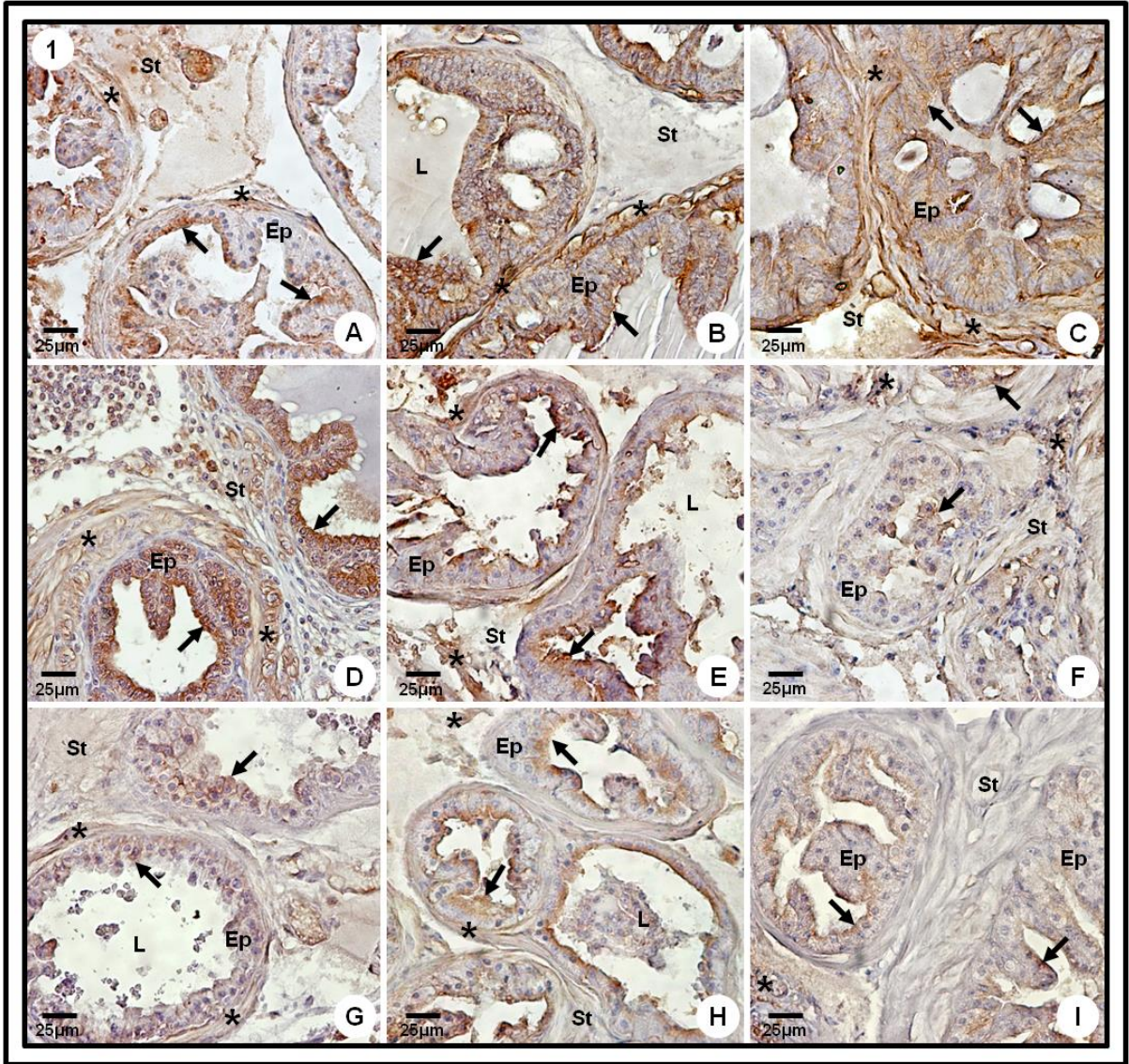
or both, respectively. Positive stromal staining is indicated as asterisks. Ep: epithelium; St: stroma; L: lumen.

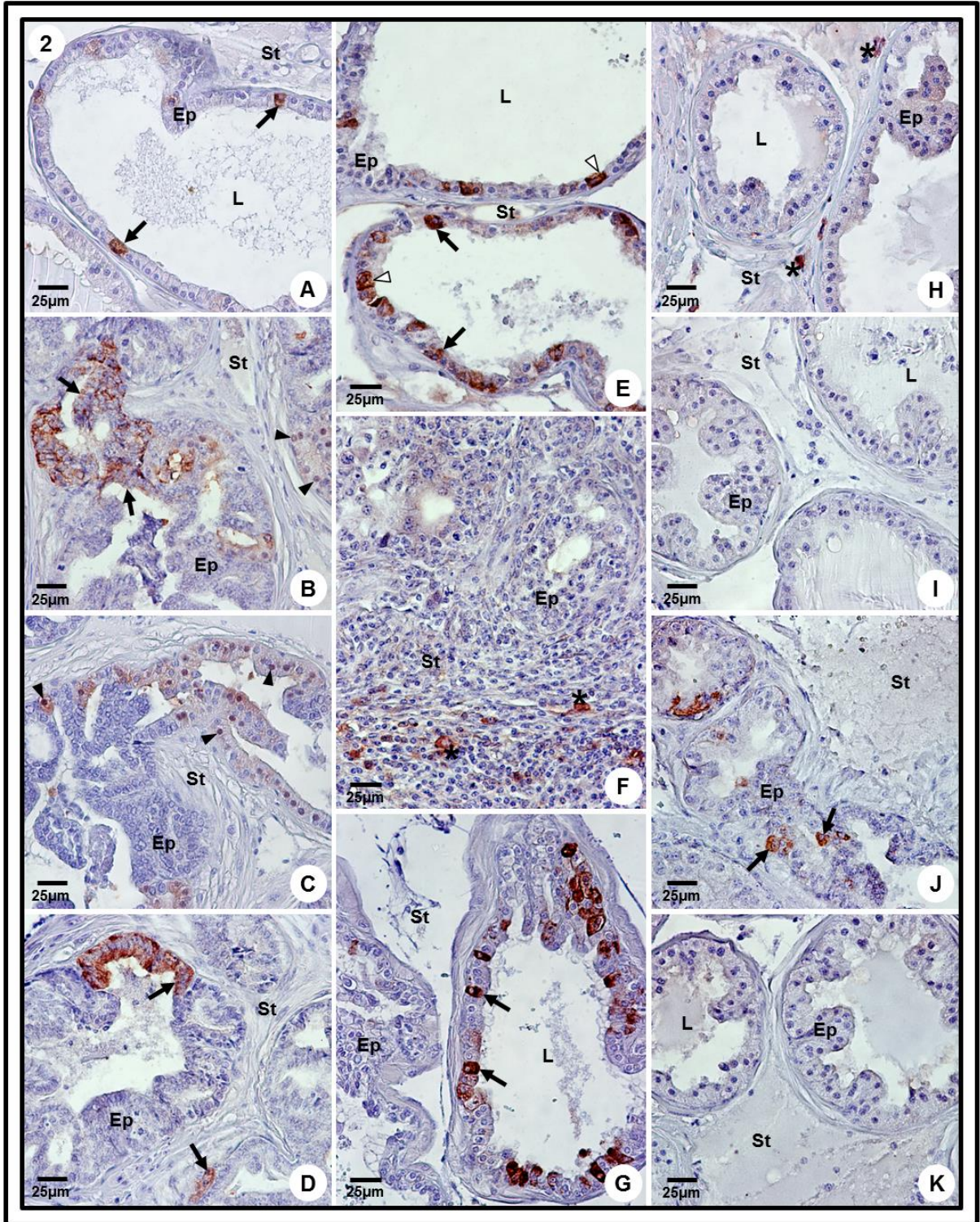
**Figure 3.** Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) immunolabeling in the dorsolateral prostate of mice of the experimental groups. A) Young Control Group (YNG); B) PIN Control Group (PIN); C) Cancer Control Group (CP); D) Senile Group (SEN); E) SU5416 Group (SU); F) TNP-470 Group (TNP); G) SU5416 + TNP-470 Group (ST); H) Finasteride Group (FIN); I) SU5416 + TNP-470 + Finasteride Group (STF). Positive epithelial and stromal immunoreactivities are indicated as arrows and asterisks, respectively. Ep: epithelium; St: stroma; L: lumen.

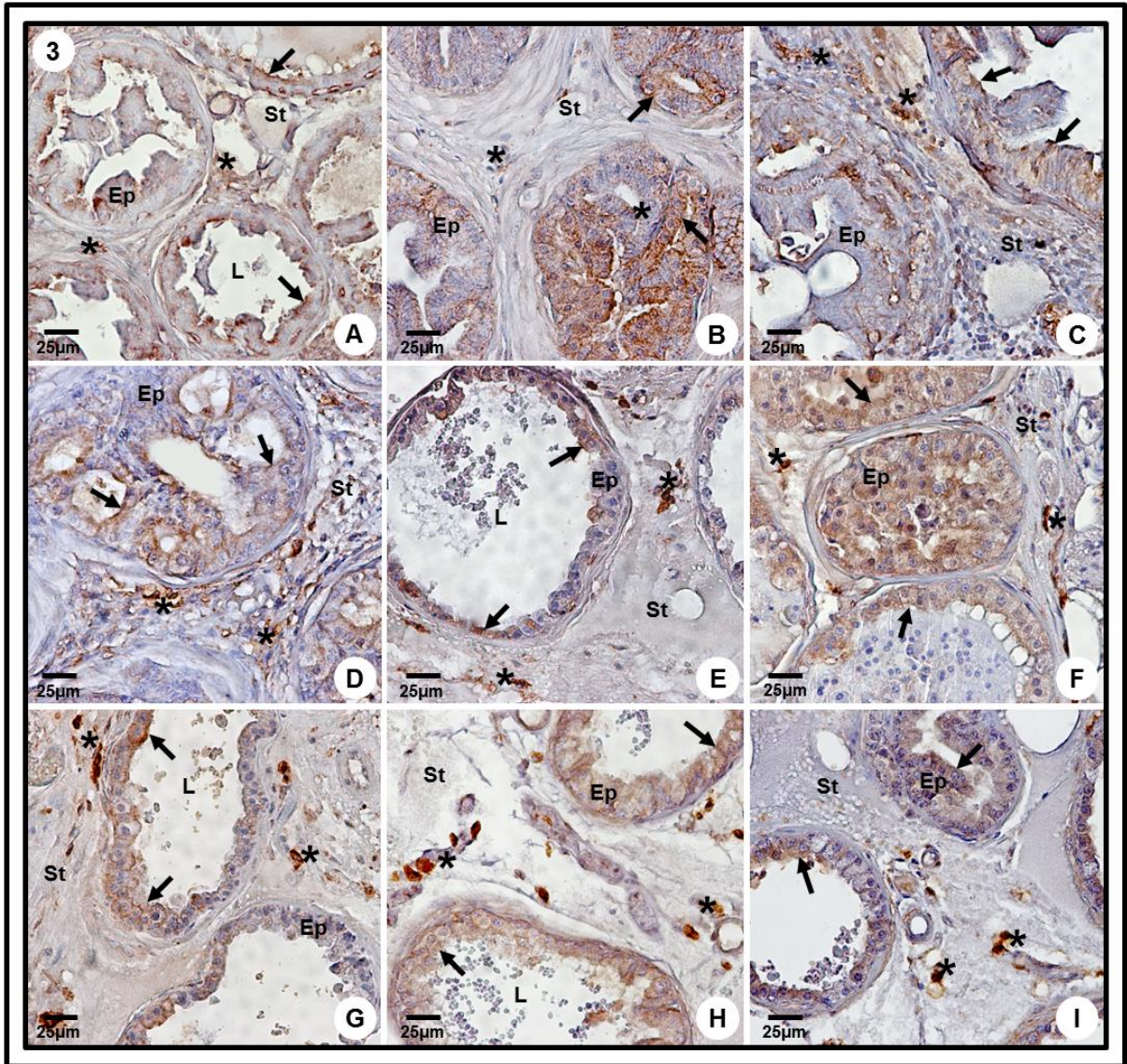
**Figure 4.** Endostatin immunolabeling in the dorsolateral prostate of mice of the experimental groups. A) Young Control Group (YNG); B) PIN Control Group (PIN); C) Cancer Control Group (CP); D) Senile Group (SEN); E) SU5416 Group (SU); F) TNP-470 Group (TNP); G) SU5416 + TNP-470 Group (ST); H) Finasteride Group (FIN); I) SU5416 + TNP-470 + Finasteride Group (STF). Positive epithelial and stromal immunoreactivities are indicated as arrows and asterisks, respectively. Ep: epithelium; St: stroma; L: lumen.

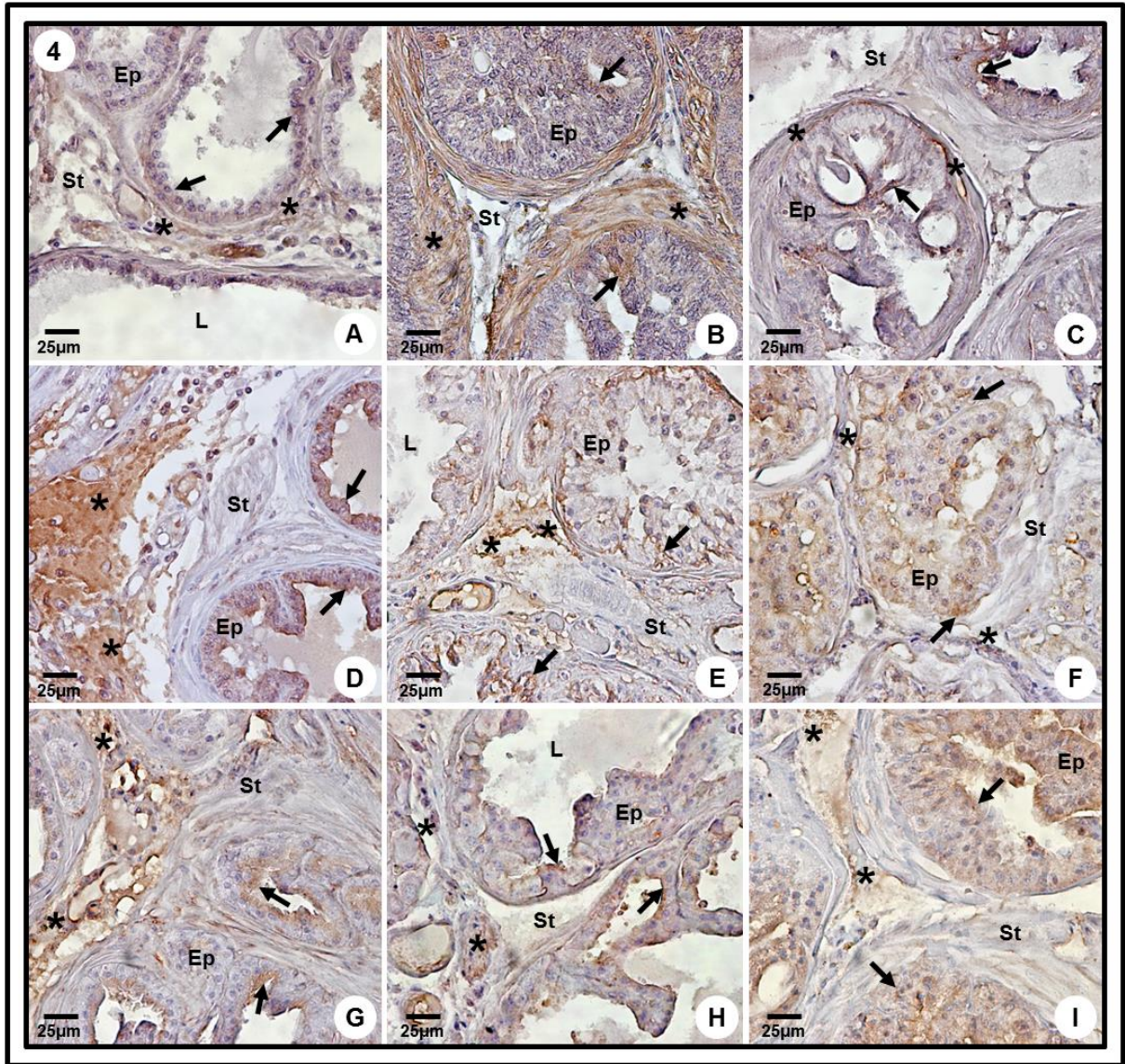
**Figure 5.** Western blotting and semiquantitative analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF), hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ), fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and endostatin protein levels in the dorsolateral prostate of mice of the experimental groups. Data is shown as the mean percentage  $\pm$  standard deviation in relation to the endogenous control  $\beta$ -Actin.

**Figure 6.** Microvessel density (MVD) analysis based on CD31 positive immunostaining in the dorsolateral prostate of mice of the experimental groups. Stromal microvessels are indicated as arrows whereas intraepithelial microvasculature is depicted as arrowheads. A) Young Control Group (YNG); B) PIN Control Group (PIN); C) Cancer Control Group (CP); D) Senile Group (SEN); E) SU5416 Group (SU); F) TNP-470 Group (TNP); G) SU5416 + TNP-470 Group (ST); H) Finasteride Group (FIN); I) SU5416 + TNP-470 + Finasteride Group (STF); J) Medium and maximum MVD values per experimental group. Ep: epithelium; St: stroma; L: lumen.

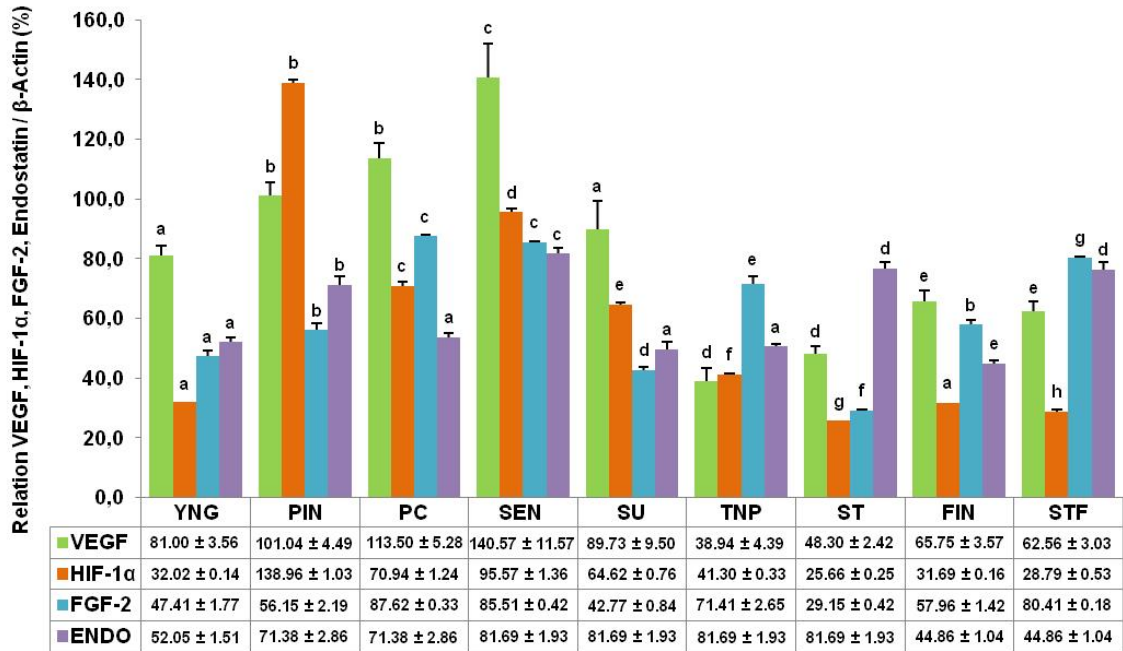
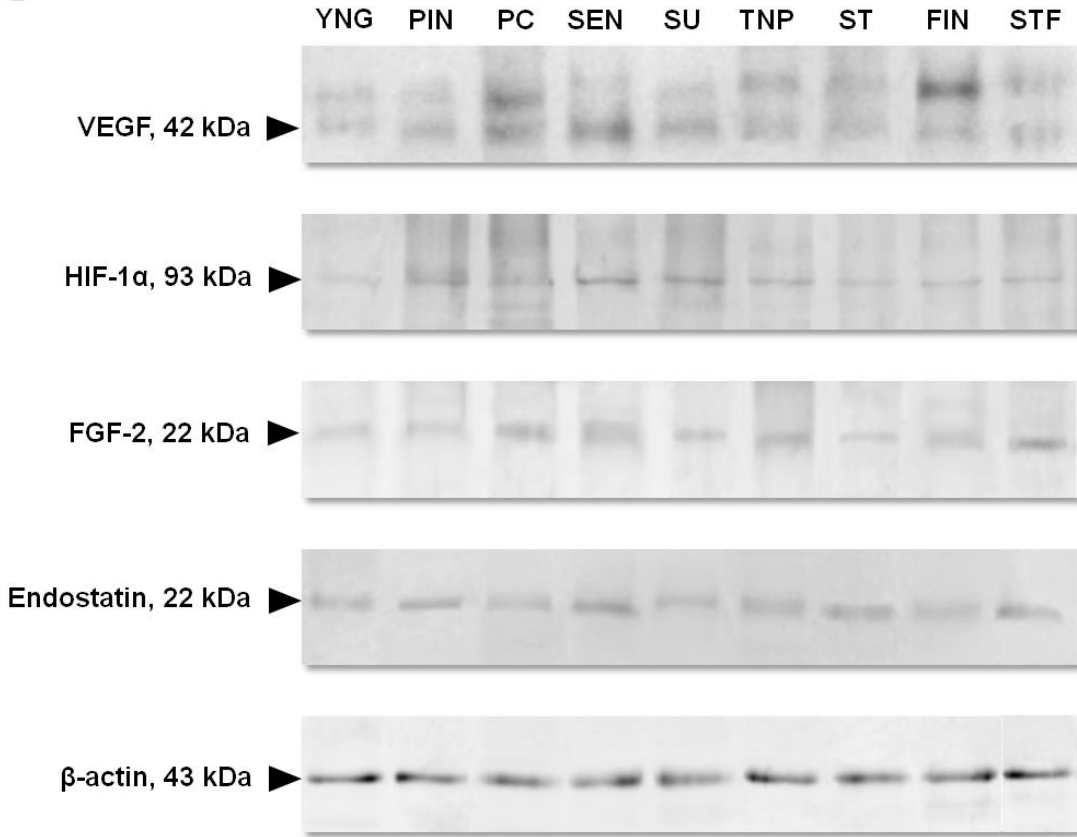




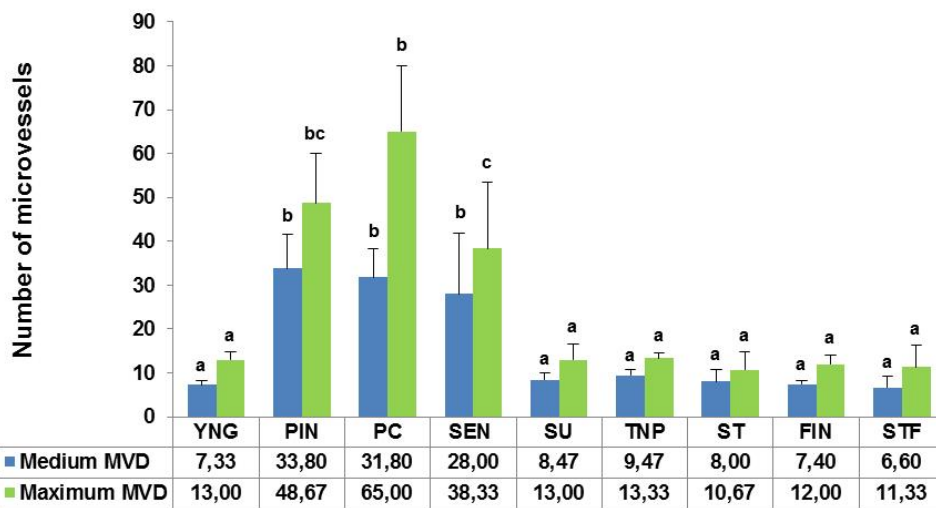
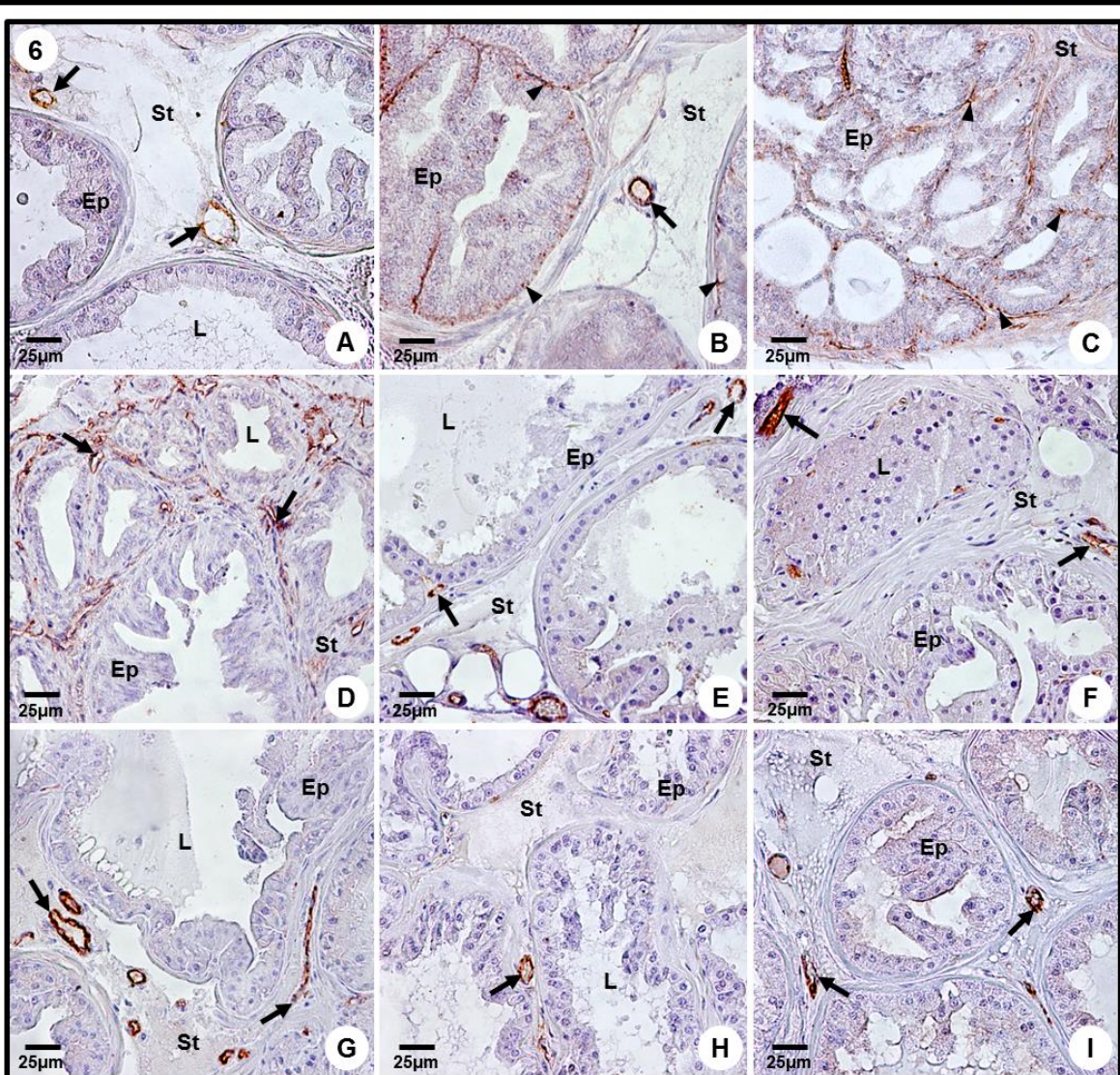




5



Different lowercase letters indicate statistically significant differences among the groups (P<0.05).



Different lowercase letters indicate statistically significant differences among the groups ( $P < 0,05$ ).



## 5.7. AKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (2010/51112-5, 2011/01968-3 and 2012/03010-4).

## 5.8. REFERENCES

- ABDOLLAHI, A., LIPSON, K.E., SCKELL, A., ZIEHER, H., KLENKE, F., POERSCHKE, D., ROTH, A., HAN, X., KRIX, M., BISCHOF, M., HAHNFELDT, P., GRONE, H.J., DEBUS, J., HLATKY, L. & HUBER, P.E. 2003. Combined therapy with direct and indirect angiogenesis inhibition results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects. *Cancer Res.* 63(24): 8890-8898.
- ABE, J., ZHOU, W., TAKUWA, N., TAGUCHI, J., KUROKAWA, K., KUMADA, M. & TAKUWA, Y. 1994. A fumagillin derivative angiogenesis inhibitor, AGM-1470, inhibits activation of cyclin-dependent kinases and phosphorylation of retinoblastoma gene product but not protein tyrosyl phosphorylation or protooncogene expression in vascular endothelial cells. *Cancer Res* 54(13): 3407-3412.
- AL-UBAIDI, F.L., SCHULTZ, N., EGEVAD, L., GRANFORS, T. & HELLEDAY, T. 2012. Castration therapy of prostate cancer results in downregulation of HIF-1 $\alpha$  levels. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 82(3): 1243-1248.
- BANERJEE, P.P., BANERJEE, S., LAI, J.M., STRANDBERG, J.D., ZIRKIN, B.R. & BROWN, T.R. 1998. Age-dependent and lobe-specific spontaneous hyperplasia in the Brown Norway rat prostate. *Biol Reprod.* 59(5): 1163-1170.
- BANERJEE, S., BANERJEE, P.P. & BROWN, T.R. 2000. Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. *Endocrinology* 141(2): 821-832.
- BANERJEE, P.P., BANERJEE, S. & BROWN, T.R. 2001. Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the Brown Norway rat prostate. *Endocrinology* 142(9): 4066-4075.
- BERGER, A.P., KOFLER, K., BEKTIC, J., ROGATSCH, H., STEINER, H., BARTSCH, G. & KLOCKER, H. 2003. Increased growth factor production in a human prostatic stromal cell culture model caused by hypoxia. *Prostate* 57(1): 57-65.
- BOEHM, T., FOLKMAN, J., BROWDER, T. & O'REILLY M.S. 1997. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390(6658): 404-407.
- BOND, S.J., KLEIN, S.A., ANDERSON, G.L. & WITTLIFF, J.L. 2000. Interaction of angiogenesis inhibitor TNP-470 with basic fibroblast growth factor receptors. *J Surg Res* 92(1): 18-22.
- CASTRONOVO, V. & BELOTTI, D. 1996. TNP-470 (AGM-1470): mechanisms of action and early clinical development. *Eur J Cancer* 32A(14): 2520-2527.
- COPPÉ, J.P., KAUSER, K., CAMPISI, J. & BEAUSÉJOUR, C.M. 2006. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem.* 281(40): 29568-29574.
- CRONAUER, M.V., HITTMAIR, A., EDER, I.E., HOBISCH, A., CULIG, Z., RAMONER, R., ZHANG, J., BARTSCH, G., REISSIGL, A., RADMAYR, C., THURNHER, M. & KLOCKER, H. 1997. Basic fibroblast growth factor levels in cancer cells and in sera of patients suffering from proliferative disorders of the prostate. *Prostate* 31(4): 223-233.
- CRONAUER, M.V., SCHULZ, W.A., SEIFERT, H.H., ACKERMANN, R. & BURCHARDT, M. 2003. Fibroblast growth factors and their receptors in urological cancers: basic research and clinical implications. *Eur Urol* 43(3): 309-319.

- DAS, K., LORENA, P.D., NG, L.K., LIM, D., SHEN, L., SLOW, W.Y., TEH, M., REICHARDT, J.K. & SALTO-TELLEZ, M. 2010. Differential expression of steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes and association with disease severity and angiogenic genes predict their biological role in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 17(3): 757-770.
- DOLL, J.A., REIHER, F.K., CRAWFORD, S.E., PINS, M.R., CAMPBELL, S.C. & BOUCK, N.P. 2001. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate. *Prostate* 49(4): 293-305.
- FIGG, W.D., KRUGER, E.A., PRICE, D.K., KIM, S. & DAHUT, W.D. 2002. Inhibition of angiogenesis: treatment options for patients with metastatic prostate cancer. *Invest New Drugs* 20(2): 183-194.
- FOLEY, S.J. & BAILEY, D.M. 2000. Microvessel density in prostatic hyperplasia. *BJU Int.* 85(1): 70-73.
- FOLKMAN, J. 2006. Antiangiogenesis in cancer therapy – endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res.* 312(5): 594-607.
- FOLKMAN, J.H.P. & HLATKY, L. 1998. The logic of anti-angiogenic gene therapy. In: Friedmann T. (Ed). *The Development of Gene Therapy*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1-17.
- FONG, T.A., SHAWVER, L.K., SUN, L., TANG, C., APP, H., POWELL, T.J., KIM, Y.H., SCHRECK, R., WANG, X., RISAU, W., ULLRICH, A., HIRTH, K.P. & McMAHON, G. 1999. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Fik-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 59(1): 99-106.
- FRANCK-LISSBRANT, I., HÄGGSTRÖM, S., DAMBER, J.E. & BERGH, A. 1998. Testosterone stimulates angiogenesis and vascular regrowth in the ventral prostate in castrated adult rats. *Endocrinology* 139(2): 451-456.
- GINGRICH, J.R., BARRIOS, R.J., FOSTER, B.A. & GREENBERG, N.M. 1999. Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2(2): 70-75.
- GIRI, D., ROPIQUET, F. & ITTMANN, M. 1999. Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 5(5): 1063-1071.
- GONZALES, G.F., GASCO, M., MALHEIROS-PEREIRA, A. & GONZALES-CASTAÑEDA, C. 2008. Antagonistic effect of *Lepidium meyenii* (red maca) on prostatic hyperplasia in adult mice. *Andrologia* 40(3): 179-185.
- GONZALEZ-MORENO, O., LECANDA, J., GREEN, J.E., SEGURA, V., CATENA, R., SERRANO, D. & CALVO, A. 2010. VEGF elicits epithelial-mesenchymal transition (EMT) in prostate intraepithelial neoplasia (PIN)-like cells via an autocrine loop. *Exp Cell Res.* 316(4): 554-567.
- GREENBERG, N.M.; DEMAYO, F.; FINEGOLD, M.J., MEDINA, D., TILLEY, W.D., ASPINALL, J.O., CUNHA, G.R., DONJACOUR, A.A., MATUSIK, R.J. & ROSEN, J.M. 1995. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(8): 3439-3443.
- HÄGGSTRÖM, S., TORRING, N., MOLLER, K., JENSEN, E., LUND, L., NIELSEN, J.E., BERGH, A. & DAMBER, J.E. 2002. Effects of finasteride on vascular endothelial growth factor. *Scand J Urol Nephrol.* 36(3): 182-187.
- HOCHBERG, D.A., BASILLOTE, J.B., ARMENAKAS, N.A., VASOVIC, L., SHEVCHUK, M., PAREEK, G. & FRACCHIA, J.A. 2002. Decreased suburethral Prostatic microvessel density in finasteride treated prostates: a possible mechanism for reduced bleeding in benign Prostatic hyperplasia. *J Urol.* 167(4): 1731-1733.
- HORTI, J., DIXON, S.C., LOGOTHETIS, C.J., GUO, Y., REED, E. & FIGG, W.D. 1999. Increased transcriptional activity of prostate-specific antigen in the presence of TNP-470, an angiogenesis inhibitor. *Br J Cancer* 79(9-10): 1588-1593.
- HUSS, W.J., HANRAHAN, C.F., BARRIOS, R.J., SIMONS, J.W. & GREENBERG, N.M. 2001. Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch. *Cancer Res.* 61(6): 2736-2743.

- HUSS, W.J., BARRIOS, R.J., FOSTER, B.A. & GREENBERG, N.M. 2003a. Differential expression of specific FGF ligand and receptor isoforms during angiogenesis associated with prostate cancer progression. *Prostate* 54(1): 8-16.
- HUSS, W.J., BARRIOS, R.J. & GREENBERG, N.M. 2003b. SU5416 selectively impairs angiogenesis to induce prostate cancer-specific apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2(7): 611-616.
- ISAYEVA, T., CHANDA, D., KALLMAN, L., ELTOUM, I.E. & PONNAZHAGAN, S. 2007. Effects of sustained antiangiogenic therapy in multistage prostate cancer in TRAMP model. *Cancer Res.* 67(12): 5789-5797.
- ISAYEVA, T., MOORE, L.D., CHANDA, D., CHEN, D. & PONNAZHAGAN, S. 2009. Tumoristatic effects of endostatin in prostate cancer is dependent on androgen receptor status. *Prostate* 69(10): 1055-1066.
- JOSEPH, I.B., NELSON, J.B., DENMEADE, S.R. & ISAACS, J.T. 1997. Androgens regulate vascular endothelial growth factor content in normal and malignant prostatic tissue. *Clin Cancer Res.* 3: 2507-2511.
- KIMBRO, K.S. & SIMONS, J.W. 2006. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 13(3): 739-749.
- KRTOLICA, A. & CAMPISI, J. 2002. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol.* 34(11): 1401-1414.
- KWABBI-ADDO, B., OZEN, M. & ITTMANN, M. 2004. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 11(4): 709-724.
- LIEKENS, S., DE CLERCQ, E. & NEYTS, J. 2001. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 61(3): 253-270.
- LYNCH, C.C. & MATRISIAN, L.M. 2002. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 70(9-10): 561-573.
- MABJEESH, N.J. & AMIR, S. 2007. Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis. *Histol Histopathol* 22(5): 559-572.
- MACPHERSON, G.R., NG, S.S.W., FORBES, S.L., MELILLO, G., KARPOVA, T., McNALLY, J., CONRADS, T.P., VEENSTRA, T.D., MARTINEZ, A., CUTTITTA, F., PRICE, D.K. & FIGG, W.D. 2003. Anti-angiogenic activity of human endostatin is HIF-1-independent in vitro and sensitive to timing of treatment in a human saphenous vein assay. *Mol Cancer Ther* 2(9): 845-854.
- MATSUSAKA, S., NAKASHO, K., TERADA, N., SUGIHARA, A., TSUJIMURA, T., TAKANASHI, T., UEMATSU, K., OKAMOTO, E. & TOYOSAKA, A. 2000. Inhibition by an angiogenesis inhibitor, TNP-470, of the growth of a human hepatoblastoma heterotransplanted into nude mice. *J Pediatr Surg.* 35(8): 1198-1204.
- MILLER, M.I. & PUCHNER, P.J. 1998. Effects of finasteride on hematuria associated with benign prostate hyperplasia: long-term follow-up. *Urology* 51(2): 237-240.
- MONTECINOS, V.P., GODOY, A., HINKLIN, J., VETHANAYAGAM, R.R., SMITH, G.J. 2012. Primary xenografts of human prostate tissue as a model to study angiogenesis induced by reactive stroma. *PLoS One* 7(1): e29623.
- MONTGOMERY, D.C. 1991. *Design and Analysis of Experiments*, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.
- MONTICO, F., KIDO, L.A., HETZL, A.C., LORENCINI, R.M., CÂNDIDO, E.M. & CAGNON, V.H. 2014. Antiangiogenic therapy effects on age-associated matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and insulin-like growth factor receptor-1 (IGFR-1) responses: a comparative study of prostate disorders in aged and TRAMP mice. *Histochem Cell Biol.* DOI: 10.1007/s00418-014-1193-2.
- MUKHERJI, D., TEMRAZ, S., WEHBE, D. & SHAMSEDDINE, A. 2013. Angiogenesis and anti-angiogenic therapy in prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 87(2): 122-131.
- O'REILLY, M.S., BOEHM, T., SHING, Y., FUKAI, N., VASIOS, G., LANE, W.S., FLYNN, E., BIRKHEAD, J.R., OLSEN, B.R. & FOLKMAN, J. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88(2): 277-285.

- PAREEK, G., SHEVCHUK, M., ARMENAKAS, N.A., VASJOVIC, L., HOCHBERG, D.A., BASILLOTE, J.B. & FRACCHIA, J.A. 2003. The effect of finasteride on the expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density: a possible mechanism for decreased prostatic bleeding in treated patients. *J Urol.* 169(1): 20-23.
- RETTET, A.S., FIGG, W.D. & DAHUT, W.L. 2003. The combination of antiangiogenic and cytotoxic agents in the treatment of prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* 2(3): 153-159.
- REYNOLDS, A.R. & KYPRIANOU, N. 2006. Growth factor signalling in prostatic growth: significance in tumour development and therapeutic targeting. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 2: S144-152.
- RIVARD, A., FABRE, J., SILVER, M., CHEN, D., MUROHARA, T., KEARNEY, M., MAGNER, M., ASHARA, T. & ISNER, J.M. 1999. Aged-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 99(1): 111-120.
- RUDOLFFSSON, S.H. & BERGH, A. 2008. Testosterone-stimulated growth of the rat prostate may be driven by tissue hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha. *J Endocrinol.* 196(1): 11-19.
- SIM, B.K., MACDONALD, N.J. & GUBISH, E.R. 2000. Angiostatin and endostatin: endogenous inhibitors of tumor growth. *Cancer Metastasis Rev.* 19(1-2): 181-190.
- SIN, N., MENG, L., WANG, M.Q., WEN, J.J., BORNMANN, W.G. & CREWS, C.M. 1997. The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(12): 6099-6103.
- SLATER, M., BARDEN, J.A. & MURPHY, C.R. 2000. Changes in growth factor expression in the ageing prostate may disrupt epithelial-stromal homeostasis. *Histochem J.* 32(6): 357-364.
- SONG, S., WIENTIES, M.G., GAN, Y. & AU, J.L. 2000. Fibroblast growth factors: an epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(15): 8658-8663.
- SOULITZIS, N., KARYOTIS, I., DELAKAS, D., SPANDIDOS, D.A. 2006. Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGF- $\beta$ 1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Int J Oncol* 29(2): 305-314.
- SPRENGER, C.C., PLYMATE, S.R. & REED, M.J. 2008. Extracellular influences on tumour angiogenesis in the aged host. *Br J Cancer* 98(2): 250-255.
- STRIETH, S., EICHHORN, M.E., SUTTER, A., JONCZYK, A., BERGHAUS, A. & DELLIAN, M. 2006. Antiangiogenic combination tumor therapy blocking alpha(v)-integrins and VEGF-receptor-2 increases therapeutic effects in vivo. *Int J Cancer* 119(2): 423-431.
- TILKI, D., KILIC, N., HERBST, H., REICH, O., SEITZ, M., LAUKE, H., STIEF, C.G. & ERGÜN, S. 2008. High level of endostatin in epididymal epithelium: protection against primary malignancies in this organ? *Histochem Cell Biol* 130(3): 527-535.
- TURK, B.E., GRIFFITH, E.C., WOLF, S., BIEMANN, K., CHANG, Y.H. & LIU, J.O. 1999. Selective inhibition of amino-terminal methionine processing by TNP-470 and ovalicin in endothelial cells. *Chem Biol* 6(11): 823-833.
- TUTRONE, R.F.Jr., BALL, R.A., ORNITZ, D.M., LEDER, P., RICHIE, J.P. 1993. Benign prostatic hyperplasia in a transgenic mouse: a new hormonally sensitive investigatory model. *J Urol.* 149(3): 633-699.
- TUXHORN, J.A., AYALA, G.E. & ROWLEY, D.R. 2001. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol.* 166(6): 2472-2483.
- TUXHORN, J.A., AYALA, G.E., SMITH, M.J., SMITH, V.C., DANG, T.D. & ROWLEY, D.R. 2002a. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res.* 8(9): 2912-2923.
- TUXHORN, J.A., McALHANY, S.J., YANG, F., DANG, T.D. & ROWLEY, D.R. 2002b. Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Res.* 62(21): 6021-6025.
- VAN MEETEREN, L.A. & TEN DJIKE, P. 2012. Regulation of endothelial cell plasticity by TGF- $\beta$ . *Cell Tissue Res* 347(1): 177-186.

- VAN MOORSELAAR, R.J. & VOEST, E.E. 2002. Angiogenesis in prostate cancer: its role in disease progression and possible therapeutic approaches. *Mol Cell Endocrinol.* 197(1-2): 239-250.
- WANG, Y.Z. & WONG, Y.C. 1998. Sex hormone-induced prostatic carcinogenesis in the Noble rat: the role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the development of prostate cancer. *Prostate* 35(3): 165-177.
- WEIDNER, N., CARROLL, P.R., FLAX, J., BLUMENFELD, W. & FOLKMAN, J. 1993. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol.* 143(2): 401-409.
- YOSHIDA, A., ANAND-APTE, B. & ZETTER, B.R. 1996. Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. *Growth Factors* 13(1-2): 57-64.
- YOSHIJI, H., HARRIS, S.R. & THORGEIRSSON, U.P. 1997. Vascular endothelial growth factor is essential for initial but not continued in vivo growth of human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 57(18): 3924–3928.
- ZAR, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th ed. Prentice Hall Upper, New Jersey.
- ZHONG, H., SEMENZA, G.L., SIMONS, J.W. & DE MARZO, A.M. 2004. Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is an early event in prostate carcinogenesis. *Cancer Detect Prev* 28(2): 88-93.



## **6. ARTIGO CIENTÍFICO III**

### **Estroma reativo na próstata de camundongos senis: papel da microvasculatura e influência de terapias antiangiogênicas**

### **Reactive stroma in the prostate of elderly mice: the role of microvasculature and antiangiogenic therapy influences**

Fabio Montico<sup>1</sup>; Larissa A. Kido<sup>1</sup>; Rebeca San Martin<sup>2</sup>; David R. Rowley<sup>2</sup>; Valéria H. A. Cagnon<sup>1</sup>.

**Artigo em fase de redação para publicação no periódico *The Prostate*.**

1- Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6109, 13083-865, Campinas, São Paulo, Brasil.

2- Molecular and Cellular Biology Department, Baylor College of Medicine, Houston, Texas 77030.

Correspondência para: Valéria H. A. Cagnon PhD, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6109, 13083-865, Campinas, São Paulo, Brasil. Telefone: (+55) (19) 3521-6103. Fax: (+55) (19) 3289-3124. E-mail: quitete@unicamp.br.

## 6.1. RESUMO

O câncer de próstata está associado a um microambiente estromal reativo favorável à progressão tumoral em decorrência da estimulação dos processos de remodelação tecidual e angiogênese. Entretanto, a origem dos tipos celulares presentes no estroma reativo, os mecanismos de indução desse fenótipo e sua relação com a senescência, principal fator predisponente para o desenvolvimento do adenocarcinoma prostático, são assunto ainda pouco elucidado. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar a possível ocorrência de reação estromal na próstata de camundongos senis, comparando-a com as observações realizadas nas lesões glandulares no modelo TRAMP bem como mediante a realização de tratamentos antiangiogênico e/ou de ablação hormonal na senescência. Os presentes resultados demonstraram que esse período da vida se caracterizou por aumento do TGF- $\beta$ , da vimentina (VIM) e da  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) e pela presença de miofibroblastos no estroma prostático, bem como por maior intensidade de co-localização dos marcadores endotélio-mesenquimais CD34/VIM e CD34/ $\alpha$ SMA. Tais registros evidenciaram a ocorrência de nítida indução do estroma reativo a partir da microvasculatura periacinar, possivelmente através do processo de transição endotélio mesenquimal (EndMT), assemelhando-se às observações no modelo TRAMP. O tratamento antiangiogênico resultou em variados graus de recuperação das alterações estromais verificadas na senescência, especialmente frente à administração do inibidor SU5416 (6 mg/kg; i.p.), quer isoladamente ou em associação com o TNP-470 (15 mg/kg; s.c.), fato que corroborou o papel da microvasculatura na iniciação da reação estromal. Por outro lado, a ablação hormonal através do tratamento com finasterida (20 mg/kg; s.c.), embora tenha levado à menor intensidade de co-localização de células positivas para CD34/VIM e CD34/ $\alpha$ SMA, apontando para a inibição do processo de EndMT, não foi capaz de restaurar e/ou interromper a reação estromal associada à senescência. Assim, registrou-se manutenção da presença de miofibroblastos e de elevados níveis de TGF- $\beta$ , VIM e  $\alpha$ SMA na próstata, mesmo frente à combinação da finasterida com os inibidores angiogênicos. Tais observações sugeriram que, mediante à inibição da angiogênese e ao estado quiescente da vasculatura prostática resultantes da ação da finasterida, o TGF- $\beta$  pode ter induzido o estroma reativo através de mecanismos alternativos à EndMT.

**Palavras-chave:** Próstata, senescência, TRAMP, estroma reativo, angiogênese.



## 6.2. INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma de próstata constitui a segunda maior causa de mortes por câncer entre homens ocidentais, sendo a doença neoplásica mais comum no sexo masculino (Sprenger *et al.*, 2008; Niu & Xia, 2009; Mukherji *et al.*, 2013). A tumorigênese inicia-se com a transformação de células normais, prosseguindo com subsequente crescimento tumoral, invasão e metástases (Tuxhorn *et al.*, 2001). Por muitos anos, a pesquisa do câncer esteve tradicionalmente focada nas alterações genéticas que ocorrem nessas células tumorais transformadas (Zeisberg *et al.*, 2007a). Recentemente, entretanto, estudos têm apontado a complexidade e desorganização dos tumores, os quais contêm, além das células neoplásicas, uma variedade de elementos estromais, como matriz extracelular (MEC), fibroblastos, células endoteliais e imunes (Tuxhorn *et al.*, 2001; Zeisberg *et al.*, 2007a). De fato, em alguns carcinomas, mais de 90% do tumor é constituído por estroma, sendo o estroma tumoral fundamentalmente diferente do estroma no tecido normal (Elenbaas & Weinberg, 2001; Tuxhorn *et al.*, 2001; Zeisberg *et al.*, 2007a).

O compartimento estromal normal possui plasticidade intrínseca para responder rapidamente a situações de injúria nas quais a homeostase tecidual é perdida, sendo que seus componentes atuam de maneira coordenada quando o epitélio sofre danos ou ruptura (Barron & Rowley, 2012). Dessa maneira, o rompimento da barreira epitelial nos estágios iniciais da carcinogênese representa um desequilíbrio na homeostase do tecido, gerando uma reação do estroma hospedeiro ao carcinoma em desenvolvimento (Tuxhorn *et al.*, 2001; Barron & Rowley, 2012). Assim, tal reação é semelhante a uma resposta genérica de reparo tecidual, caracterizando-se por proliferação das células do estroma, remodelação da MEC, aumento da atividade proteolítica e da biodisponibilidade de fatores de crescimento, influxo de células inflamatórias e indução de angiogênese (Rowley *et al.*, 1999; Tuxhorn *et al.*, 2001; Barron & Rowley, 2012). As alterações fenotípicas e genotípicas que ocorrem nas células estromais durante a reação ao dano causado pelo carcinoma epitelial têm sido designadas pelo termo “estroma reativo” (Rowley, 1999; Tuxhorn *et al.*, 2001; Barron & Rowley, 2012). Na próstata, o estroma reativo inicia-se durante lesões pré-malignas do tipo neoplasia intraepitelial prostática (NIP) e progride com o câncer até os estágios de alto-grau da doença, sendo composto principalmente por fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e miofibroblastos (Rowley, 1999; Tuxhorn *et al.*, 2001; Tuxhorn *et al.*, 2002a; Barron & Rowley, 2012).

Os miofibroblastos são células com fenótipo intermediário entre fibroblastos e células musculares lisas, tendo em vista a expressão de proteínas do citoesqueleto e aspectos ultraestruturais (Tuxhorn *et al.*, 2001). Este tipo celular está presente nas respostas clássicas de reparo tecidual e origina-se a partir da diferenciação de fibroblastos quiescentes, sendo este processo marcado pela expressão *de novo* de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA), formação de filamentos contráteis e maior desenvolvimento das organelas celulares de síntese (Tuxhorn *et al.*, 2001; Cirri & Chiarugi, 2011). Posteriormente, estas células também foram identificadas como o principal tipo celular estromal em uma variedade de condições patológicas, como em doenças fibróticas e na reação estromal em resposta a adenocarcinomas (Tuxhorn *et al.*, 2001; Barron & Rowley, 2012). Marcadores mesenquimais como vimentina (VIM),  $\alpha$ SMA, tenascina-C, proteína ativadora de fibroblastos (FAP) e pró-colágeno tipo I são expressos em miofibroblastos logo nos primeiros estágios de formação do estroma reativo associado ao carcinoma prostático (Tuxhorn *et al.*, 2002a; Cirri & Chiarugi, 2011; Barron & Rowley, 2012).

A relação existente entre CAFs e miofibroblastos bem como a dúvida se eles representam diferentes populações celulares ou correspondem a diferentes estados de uma mesma célula permanecem como assunto não esclarecido (Barron & Rowley, 2012; San Martin *et al.*, 2014). Entretanto, é fato amplamente conhecido que ambos representam células estromais ativadas em resposta ao carcinoma epitelial e que, em oposição ao papel dos fibroblastos na manutenção da homeostase tecidual na ausência de injúrias, provêm sinais biológicos que favorecem a progressão tumoral em decorrência da geração de um microambiente de reparo tecidual crônico (Barron & Rowley, 2012). Embora a diferenciação de fibroblastos em CAFs e miofibroblastos seja pouco compreendida, o TGF- $\beta$  tem sido apontado como um dos principais fatores derivados das células tumorais envolvidos na ativação desses fenótipos celulares reativos (Tuxhorn *et al.*, 2002a; Cirri & Chiarugi, 2011; Barron & Rowley, 2012). Tais células estromais, por sua vez, modificam o microambiente adjacente através da produção de diversos fatores de crescimento, proteases e citocinas que favorecem a progressão tumoral, promovendo a remodelação da MEC, proliferação, migração e sobrevivência celulares, além da atração de células inflamatórias e indução da angiogênese (Tuxhorn *et al.*, 2001; Kalluri & Zeisberg, 2006; Cirri & Chiarugi, 2011).

Acredita-se que os CAFs e miofibroblastos presentes no estroma reativo tenham origem múltipla, a qual pode variar de acordo com o tipo de tumor bem como entre

diferentes regiões de tumores individuais (Cirri & Chiarugi, 2011; Barron & Rowley, 2012). Uma das hipóteses aventadas postula que os CAFs podem se originar a partir de células endoteliais em proliferação através de um processo chamado transição endotélio-mesenquimal (EndMT) (Zeisberg *et al.*, 2007a; Cirri & Chiarugi, 2011; Zhang & Liu, 2013). A EndMT consiste em uma forma de plasticidade endotelial na qual células endoteliais residentes destacam-se de uma camada celular organizada no interior dos vasos e migram para o tecido subjacente (Potenta *et al.*, 2008). Durante este processo, tais células adquirem fenótipo mesenquimal, caracterizado por perda de junções celulares e aquisição de propriedades invasivas e migratórias (Potenta *et al.*, 2008). Além disso, ocorre total redução da expressão de marcadores endoteliais, como o CD31, e ganho de marcadores mesenquimais, como a proteína específica de fibroblastos-1 (FSP-1), a VIM e a  $\alpha$ SMA (Potenta *et al.*, 2008).

A senescência constitui outro importante fator desencadeador de alterações no microambiente estromal dos diferentes órgãos, em razão do acúmulo de fibroblastos senescentes cujo transcriptoma está alterado (Campisi, 2005; Sprenger *et al.*, 2008). Estas células secretam níveis aumentados de proteínas da MEC, metaloproteinases de matriz (MMPs), citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e angiogênicos, induzindo respostas inflamatórias e de reparo tecidual crônicas (Campisi, 2005; Sprenger *et al.*, 2008). Assim, verifica-se que fibroblastos senescentes apresentam fenótipo muito semelhante ao dos CAFs, uma vez que geram um microambiente permissivo ao desenvolvimento de lesões malignas que se assemelha ao estroma reativo (Campisi, 2005). Na próstata, em particular, esta permissividade ocorre em razão de o microambiente senil conter muitos componentes pró-angiogênicos, estimulando a formação de novos vasos no órgão durante a senescência, processo de grande importância para a progressão tumoral (Sprenger *et al.*, 2008).

Diante do exposto, os objetivos deste estudo foram caracterizar a possível ocorrência do fenótipo de estroma reativo na próstata de camundongos senis, comparando os achados às observações realizadas em diferentes estágios de lesão glandular no modelo TRAMP bem como mediante o tratamento com drogas antiangiogênicas e/ou finasterida. Ainda, objetivou-se verificar a contribuição da microvasculatura prostática para o recrutamento de células estromais ativadas durante a indução do estroma reativo sob as diferentes condições experimentais.

## 6.3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.3.1. Animais e procedimento experimental

Neste estudo foram utilizados 56 camundongos machos da linhagem FVB e 16 camundongos machos transgênicos da linhagem TRAMP (C57BL/6-Tg(TRAMP)8247Ng/J X FVB/NJ)F1/J). Os camundongos da linhagem FVB foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Com relação aos camundongos da linhagem TRAMP, estes foram obtidos através do projeto de auxílio FAPESP 2010/51112-5, tendo sido importados do *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine, EUA) e trazidos para o CEMIB, onde a colônia foi instalada. O CEMIB forneceu o número de animais previsto para o estudo e estes foram mantidos no biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional (Área de Anatomia) do Instituto de Biologia até atingirem a idade para cada tratamento, sendo então divididos nos seguintes grupos experimentais:

- a) Grupo Controle Jovem (JV):** camundongos FVB com 18 semanas de idade receberam injeções subcutâneas de 5 mL/Kg de Solução Fisiológica 0,9% por 21 dias;
- b) Grupo NIP (NIP):** camundongos transgênicos TRAMP com 8 semanas de idade receberam injeções subcutâneas de 5 mL/Kg de Solução Fisiológica 0,9% por 21 dias;
- c) Grupo Câncer (CP):** camundongos transgênicos TRAMP com 18 semanas de idade receberam injeções subcutâneas de 5 mL/Kg de Solução Fisiológica 0,9% por 21 dias;
- d) Grupo Controle Senil (SEN):** camundongos FVB com 52 semanas de idade receberam injeções subcutâneas de 5 mL/Kg/dia de Solução Fisiológica 0,9% por 21 dias;
- e) Grupo Senil + SU5416 (SU):** camundongos FVB com 52 semanas de idade receberam injeções intraperitoneais de 6 mg/Kg de SU5416 (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, EUA) diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), em

dias alternados, por 21 dias (modificado de Strieth *et al.*, 2006; Montico *et al.*, 2014);

**f) Grupo Senil + TNP-470 (TNP):** camundongos FVB com 52 semanas de idade receberam injeções subcutâneas de 15 mg/Kg de TNP-470 (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, EUA) diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), em dias alternados, por 21 dias (modificado de Matsusaka *et al.*, 2000; Montico *et al.*, 2014);

**g) Grupo Senil + SU5416 + TNP-470 (ST):** camundongos FVB com 52 semanas de idade receberam tratamento simultâneo com SU5416 e TNP-470, de acordo com os mesmos protocolos estabelecidos para os grupos SU e TNP;

**h) Grupo Senil + Finasterida (FIN):** camundongos FVB com 52 semanas de idade receberam injeções subcutâneas de 20 mg/Kg de finasterida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), em dias alternados, por 21 dias (modificado de Tutrone *et al.*, 1993 e Gonzales *et al.*, 2008; Montico *et al.*, 2014);

**i) Grupo Senil + SU5416 + TNP-470 + Finasterida (STF):** camundongos FVB com 52 semanas de idade receberam tratamento simultâneo com SU5416, TNP-470 e finasterida, de acordo com os mesmos protocolos estabelecidos para os grupos SU, TNP e FIN.

Os animais dos grupos experimentais receberam água e a mesma dieta sólida *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil). Após 21 dias de tratamento, todos os animais foram pesados em balança semi-analítica Marte AS 5500 (São Paulo, SP, Brasil), anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (5mg/kg i.m.; König, São Paulo, SP, Brasil) e Cloridrato de Cetamina 10% (60mg/kg i.m.; Fort Dodge, IA, EUA) e eutanasiados. Amostras do lobo dorsolateral foram coletadas e processadas para análises imunohistoquímicas e de Western Blotting.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – Unicamp, protocolo nº. 2386-1) e os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos para pesquisa animal estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA).

### 6.3.2. Imunohistoquímica

#### **Imunohistoquímica para TGF- $\beta$ , VIM e $\alpha$ SMA**

Amostras prostáticas de quatro animais de cada grupo experimental foram utilizadas para as imunomarcações. Os cortes foram obtidos com 5  $\mu$ m de espessura no micrótomo Hyrax M60 (Zeiss, Munique, Alemanha) e coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato 10 mM (pH 6,0) em forno de microondas para o TGF- $\beta$  e o  $\alpha$ SMA ou, alternativamente, por incubação com proteinase K 2  $\mu$ g/mL em tampão Tris-EDTA 150mM para a VIM. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3% em metanol), seguido por incubação dos cortes em solução bloqueadora com albumina de soro bovino (BSA 3% em tampão TBS-T) por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os antígenos TGF- $\beta$ , VIM e  $\alpha$ SMA foram localizados através dos anticorpos: *rabbit* policlonal anti-TGF- $\beta$  (sc-146) (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA), *mouse* monoclonal anti-VIM (ab8069) (Abcam, EUA) e *rabbit* policlonal anti- $\alpha$ SMA (ab5694) (Abcam, EUA), diluídos (1:50 - 1:200) em BSA 1% e aplicados aos cortes *overnight* a 4°C. Após série de lavagens em tampão TBS-T, as secções teciduais foram incubadas com anticorpos secundários conjugados à enzima *horse radish peroxidase* (HRP) por 2 horas em temperatura ambiente. Os anticorpos secundários utilizados foram *goat* anti-*rabbit* IgG (W4011) (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) e *goat* anti-*mouse* IgG (W4021) (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). Após novas lavagens em tampão TBS-T, a imunorreatividade dos antígenos foi revelada com solução cromogênica de diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 10 min. Os cortes foram então contra-corados com Hematoxilina de Harris (TGF- $\beta$  e  $\alpha$ SMA) ou Verde-metil (VIM), desidratados, montados em Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) e avaliados no fotomicroscópio Nikon Eclipse E-400 (Nikon, Tóquio, Japão). As secções prostáticas dos quatro animais de cada grupo experimental foram avaliadas através do precipitado acastanhado de DAB, que indica a imunorreatividade dos anticorpos. A distribuição da imunorreatividade foi graduada em uma escala de 0-3, estabelecida de acordo com a porcentagem da área positiva para cada antígeno em dez campos sob aumento de 400X, sendo: 0 (ausente) = 0%; 1 (fraca) = 1-33%; 2 (moderada) = 34-66%; e 3 (intensa) = mais de 66% (modificado de Tuxhorn *et al.*, 2002a).

### **Co-localização imunohistoquímica dos antígenos CD34/ $\alpha$ SMA e CD34/VIM**

A identificação de possíveis células em processo de EndMT foi realizada pela co-localização de um marcador de células endoteliais, o CD34, com um dos seguintes marcadores mesenquimais:  $\alpha$ SMA ou VIM. Estes experimentos foram conduzidos no laboratório do Prof. Dr. David R. Rowley, junto ao Baylor College of Medicine, Houston, Texas, EUA, tendo sido selecionadas aleatoriamente amostras de três animais de cada um dos grupos experimentais. Para as reações imunohistoquímicas empregou-se o método *MicroProbe Staining System* (Fisher Scientific, EUA). Neste método, são utilizadas lâminas providas de espaçadores que, ao serem pareadas face a face, criam um espaço capilar através do qual as diferentes soluções podem atingir as secções do tecido. Secções de 5  $\mu$ m de espessura foram coletadas nestas lâminas e desparafinadas a 100°C durante 3 a 5 minutos, com subsequentes passagens em xilol e série decrescente de alcoóis. A recuperação antigênica foi realizada lavando-se os cortes em tampão citrato (pH 6,0) e posteriormente incubando-os em um vaporizador a 100°C durante 20 minutos. Após o resfriamento das secções teciduais, procedeu-se ao bloqueio das peroxidases endógenas por incubação em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3% em PBS) por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado incubando-se os cortes em *Protein Blocker* (Open Biosystems, EUA) por 5 minutos a 50°C, seguido por incubação em soro de cabra (5% em tampão de lavagem) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados overnight a 4°C com os seguintes anticorpos primários diluídos em *Primary Antibody Diluent* (Open Biosystems, EUA): *rat* monoclonal anti-CD34 (1:200) (ab8158, Abcam, EUA), *rabbit* monoclonal anti- $\alpha$ SMA (1:1000) (ab32575, Abcam, EUA) e *rabbit* monoclonal anti-VIM (1:500) (ab92547, Abcam, EUA). No dia seguinte, as secções prostáticas foram incubadas a 37°C por 45 minutos com os seguintes anticorpos secundários: *goat* anti-*rat* biotinilado (1:500) (A10517, Invitrogen, EUA) e *goat* anti-*rabbit* HRP-conjugado (pronto para uso) (3051-1, Epitomics, EUA). A reação de conjugação do anticorpo biotinilado com a enzima fosfatase alcalina (AP) foi realizada utilizando-se o *VECTASTAIN ABC-AP kit (Standard)* (AK-5000, Vector Laboratories, EUA) com adição de Levamisole (30mg/mL) (L-9756, Sigma-Aldrich, EUA) para bloqueio da atividade da AP endógena, sendo que os cortes foram incubados na solução resultante por 30 minutos em temperatura ambiente. A seguir, procedeu-se à detecção dos antígenos no tecido pela adição dos substratos cromogênicos. Para a detecção do CD34, complexado à enzima AP, utilizou-se o *VECTOR Blue Alkaline Phosphatase Substrate kit* (SK-5300, Vector Laboratories, EUA)

durante 20 minutos, gerando precipitado de cor azul. Já para a detecção de  $\alpha$ SMA ou VIM, as quais estavam complexadas à enzima HRP, foi utilizado o *ImmPACT NovaRED Peroxidase Substrate kit* (SK-4805, Vector Laboratories, EUA) por 10 minutos, tendo sido gerado um precipitado de cor vermelho escura. Por fim, os cortes foram contra-corados em *Methyl Green* (H-3402, Vector Laboratories, EUA) a 60°C durante 3 minutos, sendo em seguida desidratados e montados utilizando-se *VectaMount Permanent Mounting Medium* (H-5000, Vector Laboratories, EUA).

A análise dos tecidos e documentação fotográfica foi realizada através do sistema de análise multiespectral *Nuance* (PerkinElmer, EUA). Este equipamento possibilita que uma determinada região do tecido seja fotografada em diferentes comprimentos de onda separados por intervalos definidos que abrangem toda a extensão do espectro de luz visível, resultando nos chamados “cubes”. Posteriormente, estes “cubes” podem ser decompostos a partir de uma curva de calibração para formar uma imagem contendo apenas os comprimentos de onda correspondentes às cores de interesse, que neste caso eram o vermelho (*NovaRED*), o verde (*Methyl Green*) e o azul (*VECTOR Blue*). Assim, estes canais podem ser isolados, permitindo identificar os pixels da imagem que apresentam cada uma das cores, bem como a combinação das mesmas. Desse modo, nas análises de co-localização foi possível identificar todos os pixels em vermelho como marcação positiva para  $\alpha$ SMA ou VIM, os azuis como positivos para CD34 e os verdes para o *Methyl Green*, sendo que qualquer ponto da imagem contendo as três cores era considerado como um ponto de co-localização de CD34/ $\alpha$ SMA ou CD34/VIM. A reatividade foi graduada em uma escala de 0-3 com base na avaliação qualitativa da área positiva para cada par de antígenos, sendo: 0 = ausente; 1 = fraca; 2 = moderada; e 3 = intensa.

### **Imunohistoquímica para GSL-1**

Considerando que os marcadores utilizados para a detecção de possíveis células em EndMT (CD34,  $\alpha$ SMA e VIM) também são expressos pelo endotélio ou pelas células musculares lisas e pericitos associados aos vasos, encontrou-se certa dificuldade em definir se um determinado ponto de dupla-marcação positiva correspondia a uma única célula ou a um vaso sanguíneo. Na tentativa de realizar essa distinção, foram realizadas reações imunohistoquímicas para a lectina *Griffonia Simplicifolia Lectin I* (GSL-1), que se liga a resíduos específicos de carboidratos e tem sido utilizada em diversos estudos como um marcador de células endoteliais murinas (Clavel *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007). Neste



caso, a recuperação antigênica foi realizada por digestão enzimática com tripsina (*Trypsin Enzymatic Antigen Retrieval Solution*, Ab970, Abcam, EUA), com incubação a 37°C durante 5 minutos. Para o bloqueio de resíduos de carboidratos inespecíficos empregou-se a solução bloqueadora *Carbo-Free Blocking Solution* (SP-5040, Vector Laboratories, EUA) por 30 minutos em temperatura ambiente. A seguir, as secções teciduais foram incubadas com a lectina biotinilada *Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia Lectin I* (5 µg/mL em PBS) (B-1105, Vector Laboratories, EUA), também durante 30 minutos em temperatura ambiente. Procedeu-se então à reação de conjugação da GSL-1 com a enzima AP, conforme já descrito, e subsequente detecção do antígeno nos tecidos com os kits *VECTOR Blue Alkaline Phosphatase Substrate kit* (SK-5300, Vector Laboratories, EUA) ou *VECTOR Red Alkaline Phosphatase Substrate kit* (SK-5100, Vector Laboratories, EUA), os quais geraram precipitados das cores azul ou rosa, respectivamente. As lâminas foram então contra-coradas com *Methyl Green* (H-3402, Vector Laboratories, EUA) ou Hematoxilina de Mayer (S216-3302, Poly Scientific, EUA), dependendo do cromógeno utilizado, desidratadas e montadas.

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

Amostras do lobo dorsolateral de quatro animais de cada grupo experimental foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e utilizadas para os procedimentos de Western Blotting. As amostras de tecido foram pesadas e homogeneizadas com auxílio do *Polytron* (Kinematica Inc., Lucerna, Suíça) em tampão de extração RIPA (Millipore, Temecula, Califórnia, EUA) na proporção de 50 µL/mg de tecido. Os extratos dos tecidos foram obtidos por centrifugação a 14000 rpm / 4°C durante 20 min. Uma alíquota de cada amostra foi usada para determinação da concentração de proteínas, usando o reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA). Volumes correspondentes a 75 µg de proteínas foram misturadas com tampão Laemmli (1:1), incubados a 100°C por 5 min e aplicados em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente para membranas de nitrocelulose (Amersham, Pharmacia Biotech, Arlington Heights, EUA) a 70 V durante 3 horas. As membranas foram então bloqueadas com BSA 3% diluído em TBS-T por uma hora e incubadas com os seguintes anticorpos primários diluídos (1:250 - 1:500) em BSA 1%: *mouse* monoclonal anti-TGF-β (ab64715) (Abcam, EUA), *mouse* monoclonal anti-VIM (ab8069) (Abcam, EUA) e *rabbit* policlonal anti-αSMA (ab5694) (Abcam, EUA). Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas com os mesmos anticorpos

secundários conjugados à HRP utilizados nas reações imunohistoquímicas, diluídos (1:2000-1:20000) em BSA 1%. Após nova série de lavagens com TBS-T, a detecção das bandas proteicas foi realizada por incubação das membranas em solução de quimioluminescência (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) por 5 minutos, seguida por captura da fluorescência através do equipamento *Gene Gnome* e do software de aquisição de imagem *GeneSnap* (Syngene, Cambridge, Reino Unido). O anticorpo *mouse* monoclonal anti- $\beta$ -actina (sc-81178) (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) foi usado como controle endógeno. A intensidade das bandas obtidas nos diferentes grupos experimentais foi determinada por densitometria através do programa de análise de imagens *Image J (Image Analysis and Processing in Java)* e expressa como a porcentagem média em relação à intensidade das bandas de  $\beta$ -actina.

#### **6.3.4. Análise estatística**

Os níveis proteicos quantificados nas análises de Western Blotting foram analisados estatisticamente para os diferentes grupos empregando-se a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação entre médias. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5% e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (Montgomery, 1991; Zar, 1999).

### **6.4. RESULTADOS**

#### **6.4.1. Imunohistoquímica**

##### **Grupo Controle Jovem (JV)**

Os animais do grupo JV apresentaram reatividade epitelial moderada e estromal fraca para o TGF- $\beta$  (Fig. 1A; Tabela 1). No estroma, verificou-se imunolocalização moderada para a  $\alpha$ SMA, ao passo que a VIM foi detectada com intensidade fraca, sendo representada por delgada faixa periacinar de células positivas para essa molécula (Figs. 2A e 2B; Tabela 1). As análises de co-localização revelaram fraca intensidade de células positivas tanto para CD34/ $\alpha$ SMA (Figs. 3A, 3D, 3F e 3I; Tabela 2) como para CD34/VIM (Figs. 3B, 3E, 3H e 3J; Tabela 2) no estroma prostático destes animais. Células positivas para CD34/ $\alpha$ SMA/VIM também foram verificadas (Figs. 3I e 3J). A maioria das células duplo-positivas foi componente de capilares sanguíneos e delgados microvasos dispostos

ao redor dos ácinos, conforme demonstrado pela imunohistoquímica para GSL-1 (Figs. 3C, 3D e 3E), embora células com essas características também tenham sido detectadas externamente aos vasos (Figs. 3H, 3I e 3J). O epitélio glandular da próstata dos animais jovens apresentou morfologia típica, com células colunares e pregueamento da mucosa (Figs. 3A, 3B e 3C).

### **Grupo Controle NIP (NIP)**

O TGF- $\beta$  caracterizou-se por imunolocalização intensa no compartimento epitelial e fraca no estroma glandular (Fig. 1B; Tabela 1). VIM e  $\alpha$ SMA apresentaram, respectivamente, reatividades moderada e intensa no estroma glandular, sendo que células estromais com co-expressão desses marcadores foram detectadas, correspondendo a miofibroblastos (Figs. 2C e 2D; Tabela 1). Além disso, este grupo apresentou co-localização de intensidade fraca para CD34/ $\alpha$ SMA (Fig. 4A e 4D; Tabela 2) e moderada para CD34/VIM (Fig. 4B e 4E; Tabela 2). A GSL-1 demonstrou imunorreatividade também no epitélio glandular, o qual se caracterizou por hiperplasia e focos de NIP (Fig. 4C). Assim, essa molécula não apresentou especificidade para vasos sanguíneos, o que dificultou a distinção entre células duplo-positivas componentes da rede vascular ou isoladas no estroma (Fig. 4C). Entretanto, considerando a morfologia dos pontos com co-localização positiva, pode-se indicar que muitos deles, em especial no caso da marcação de CD34/VIM, representam células estromais individuais e não vasos sanguíneos.

### **Grupo Controle Câncer (CP)**

No grupo CP, o TGF- $\beta$  caracterizou menor intensidade de imunolocalização em relação aos grupos JV e NIP, apresentando reatividade fraca tanto no epitélio quanto no estroma (Fig. 1C; Tabela 1). Em contrapartida, tanto a VIM quanto a  $\alpha$ SMA demonstraram imunomarcção intensa, inclusive com registro de co-expressão dessas moléculas, indicando a presença de miofibroblastos no estroma prostático (Figs. 2E e 2F; Tabela 1). Células estromais positivas para CD34/ $\alpha$ SMA foram detectadas com intensidade moderada (Fig. 4F e 4I; Tabela 2), ao passo que a co-localização de CD34/VIM foi intensa ao redor dos ácinos glandulares (Figs. 4G e 4J; Tabela 2). Assim como no grupo NIP, embora a GSL-1 não tenha apresentado especificidade para detecção de vasos sanguíneos (Fig. 4H), acredita-se que a maioria dos pontos de co-localização positiva

para CD34/ $\alpha$ SMA ou CD34/VIM represente células do estroma glandular. O epitélio apresentou intensa hiperplasia e projeções cribriformes, além de pontos de ruptura da membrana basal e invasão para o estroma, caracterizando focos de adenocarcinoma (Figs. 4G e 4J).

### **Grupo Senil (SEN)**

O TGF- $\beta$  demonstrou ausência de reatividade no epitélio e imunolocalização intensa no estroma prostático do grupo SEN (Fig. 1D; Tabela 1). No estroma, verificou-se intensa positividade de VIM e  $\alpha$ SMA bem como ocorrência de miofibroblastos (Figs. 2G e 2H; Tabela 1). De forma semelhante, intensa co-localização foi caracterizada tanto para CD34/ $\alpha$ SMA (Figs. 5A e 5B; Tabela 2) como para CD34/VIM (Figs. 5C e 5D; Tabela 2), com extensas áreas de dupla positividade no estroma. A imunohistoquímica para GSL-1 demonstrou, entretanto, que grande parte destes pontos de co-localização de CD34/VIM representava vasos sanguíneos (Fig. 5E). Assim, em contraste com o observado no grupo JV, verificou-se a existência de extensa rede microvascular circundando os ácinos, principalmente aqueles nos quais havia algum tipo de alteração morfológica, como hiperplasia epitelial, focos de NIP ou câncer. Apesar disso, também foi possível observar pontos de co-localização que muito provavelmente representavam células estromais isoladas, em especial nas proximidades de capilares sanguíneos (Figs. 5F e 5G). Outro fato relevante foi a observação de infiltrados de células positivas para VIM ou para CD34/VIM entre as células epiteliais em regiões onde o epitélio apresentava arranjo cribriforme (Fig. 5H e 5I). Tal fato evidenciou a perda da compartimentalização glandular em epitélio e estroma e indicou, portanto, a ocorrência de focos de adenocarcinoma prostático.

### **Grupo SU5416 (SU)**

No grupo SU, o TGF- $\beta$  apresentou reatividade epitelial fraca e imunomarcagem de intensidade moderada no estroma (Fig. 1E; Tabela 1). Ambos os marcadores estromais VIM e  $\alpha$ SMA demonstraram imunolocalização fraca, concentrada sobretudo em delgada faixa periacinar (Figs. 6A e 6B; Tabela 1). Em concordância, fraca co-localização foi caracterizada tanto para CD34/ $\alpha$ SMA (Figs. 7A e 7D; Tabela 2) quanto para CD34/VIM (Figs. 7B e 7E; Tabela 2), demonstrando a notável redução da rede microvascular presente ao redor dos ácinos glandulares, como evidenciado pela imunolocalização de

GSL-1 (Fig. 7C). Em concordância com essas observações, os ácinos prostáticos apresentaram tendência à atrofia em algumas regiões (Figs. 7A e 7B), contrastando com os focos de hiperplasia, NIP e até mesmo adenocarcinoma caracterizados no grupo SEN. Entretanto, em algumas regiões em que houve persistência de alterações hiperplásicas no epitélio, a maior intensidade de imunolocalização de células positivas para CD34/ $\alpha$ SMA constituiu observação interessante (Figs. 7F e 7I). A imunomarcagem de GSL-1 demonstrou que a maior parte destas células era componente da microvasculatura adjacente (Fig. 7H). Apesar deste fato, não foi observada diferença em relação à marcação de CD34/VIM nessas áreas (Figs. 7G e 7J). Além disso, vale ressaltar que células duplo-positivas não integrantes de vasos sanguíneos raramente foram observadas neste grupo.

#### **Grupo TNP-470 (TNP)**

No grupo TNP, o TGF- $\beta$  registrou reatividade moderada no epitélio secretor e positividade fraca no compartimento estromal (Fig. 1F; Tabela 1). De maneira semelhante ao grupo SEN, presença de miofibroblastos bem como intensa imunolocalização para VIM e  $\alpha$ SMA foram caracterizadas (Figs. 6C e 6D; Tabela 1). Células positivas para CD34/ $\alpha$ SMA e CD34/VIM foram detectadas com intensidade moderada no estroma (Figs. 8A, 8B, 8C e 8D; Tabela 2). Tais padrões de reatividade estiveram associados à manutenção da hiperplasia epitelial observada no grupo SEN (Figs. 8A e 8B). Além disso, verificou-se que muitos dos pontos de dupla marcação pareciam representar células estromais isoladas e não vasos sanguíneos, muito embora neste grupo a imunohistoquímica para GSL-1 não tenha fornecido resultados satisfatórios que permitissem a confirmação dessa observação.

#### **Grupo SU5416 + TNP-470 (ST)**

O grupo tratado com a combinação dos inibidores angiogênicos apresentou características intermediárias em relação aos grupos que receberam cada droga isoladamente. O TGF- $\beta$  apresentou imunolocalização fraca tanto no epitélio quanto no estroma prostático (Fig. 1G; Tabela 1). De forma semelhante ao grupo SU, VIM,  $\alpha$ SMA e a co-localização CD34/VIM caracterizaram reatividade fraca, com simultânea recuperação da hiperplasia epitelial associada à senescência (Figs. 6E, 6F, 8G e 8J; Tabelas 1 e 2). Em contraste, células estromais positivas para CD34/ $\alpha$ SMA foram detectadas com

intensidade moderada, assim como no grupo TNP (Figs. 8F e 8I; Tabela 2). Além disso, embora não tenha sido específica para células endoteliais, a marcação de GSL-1 indicou que algumas das células com dupla positividade para esses marcadores não aparentavam ser componentes de vasos sanguíneos (Figs. 8G, 8H e 8I).

### **Grupo Finasterida (FIN)**

No grupo FIN, o TGF- $\beta$  demonstrou reatividade epitelial moderada e estromal intensa (Fig. 1H; Tabela 1). VIM e  $\alpha$ SMA apresentaram imunolocalização moderada, com presença de miofibroblastos no estroma prostático adjacente a focos de alterações epiteliais persistentes (Figs. 9A e 9B; Tabela 1). Em oposição, a intensidade de co-localização de CD34/ $\alpha$ SMA e CD34/VIM foi caracterizada como fraca (Figs. 10A, 10B, 10D e 10E; Tabela 2). Praticamente todos os pontos de dupla marcação observados no estroma coincidiram com locais onde a presença de microvasos foi detectada pela positividade de GSL-1 (Fig. 10C). Tais microvasos dispuseram-se formando delgada rede microvascular ao redor de ácinos cujo epitélio secretor apresentou-se colunar e pregueado (Fig. 10C).

### **Grupo SU5416 + TNP-470 + Finasterida (STF)**

A imunorreatividade do TGF- $\beta$  foi intensa no epitélio glandular e moderada no estroma dos animais do grupo STF (Fig. 1I; Tabela 1). Os marcadores estromais VIM e  $\alpha$ SMA caracterizaram positividade intensa, com presença de miofibroblastos periacinares (Figs. 9C e 9D; Tabela 1). Por outro lado, seguindo o mesmo padrão verificado no grupo FIN, a co-localização de CD34/ $\alpha$ SMA apresentou-se fraca no estroma glandular (Figs. 10F e 10G; Tabela 2).

#### **6.4.2. Western Blotting**

As análises de Western Blotting demonstraram que os níveis proteicos de TGF- $\beta$ , VIM e  $\alpha$ SMA estão de acordo com os padrões de reatividade observados nas análises imunohistoquímicas (Fig. 11).

### **6.5. DISCUSSÃO**

Os presentes resultados demonstraram que a senescência se caracterizou por intensa positividade de TGF- $\beta$ , VIM e  $\alpha$ SMA no estroma prostático, bem como com maior

intensidade de co-localização dos marcadores CD34/ $\alpha$ SMA e CD34/VIM neste compartimento. Além disso, verificou-se que muitas das células com dupla positividade eram componentes de uma extensa rede microvascular disposta ao redor dos ácinos glandulares, corroborando a já conhecida relação entre angiogênese e o microambiente prostático no indivíduo senil. Entretanto, pela primeira vez, tais células também foram frequentemente detectadas de maneira isolada no estroma durante a senescência, indicando a ocorrência de tipos celulares possivelmente em processo de EndMT e evidenciando a contribuição da microvasculatura prostática na indução do estroma reativo durante esse período da vida. Nesse sentido, verificou-se semelhança com as lesões prostáticas em camundongos TRAMP, especialmente no estágio de adenocarcinoma bem diferenciado, em que o estroma reativo também se caracterizou por intensa reatividade de células positivas para CD34/VIM. Em adição, a comparação dos padrões de co-localização de CD34/ $\alpha$ SMA nos grupos JV, CP e SEN levou à identificação de diferentes fenótipos estromais, permitindo o estabelecimento de uma escala crescente de graus de reação estromal, a saber: 1) o estroma quiescente do animal jovem, com raros pontos de dupla marcação (Figs. 12A e 12B); 2) o estroma reativo observado no grupo CP, no qual o câncer já está instalado, havendo co-localização moderada de CD34/ $\alpha$ SMA (Fig. 12C e 12D); e 3) o estroma reativo associado à senescência, período em que se iniciam as transformações malignas que deflagram o desenvolvimento do câncer, caracterizado por intensa co-localização dessas moléculas (Figs. 12E e 12F).

Assim como neste estudo, diferentes autores também registraram aumento da reatividade estromal do TGF- $\beta$  na senescência (Slater *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2002). Segundo Slater *et al.* (2000), o aumento dos níveis de TGF- $\beta$  no estroma seria uma resposta ao acréscimo na proliferação epitelial que normalmente ocorre ao longo da senescência, considerando o papel inibidor do crescimento dessa citocina. Além disso, nesse período da vida, fibroblastos senescentes que se acumulam no estroma secretam níveis aumentados de componentes da MEC, MMPs, citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e angiogênicos, caracterizando fenótipo muito semelhante ao dos CAFs (Olumi *et al.*, 1999; Campisi *et al.*, 2005; Coppé *et al.*, 2006). Nesse contexto, convém ressaltar que o TGF- $\beta$  tem sido apontado como o principal indutor da reação estromal que ocorre no câncer (Tuxhorn *et al.*, 2002a; Tuxhorn *et al.*, 2002b; Verona *et al.*, 2007). Diversos estudos demonstraram que o TGF- $\beta$  é capaz de induzir reação estromal tanto *in vitro* quanto *in vivo*, com ativação de miofibroblastos, produção e remodelação de componentes específicos da MEC e aumento da angiogênese, resultando em um

microambiente favorável à progressão tumoral, particularmente nos estágios iniciais da tumorigênese (Tuxhorn *et al.*, 2001; Tuxhorn *et al.*, 2002a; Verona *et al.*, 2007). Na próstata, Tuxhorn *et al.* (2002a) sugeriram que a origem do estroma reativo ocorre logo nos primeiros estágios do desenvolvimento tumoral pela ativação de um anel periacinar de fibroblastos imediatamente adjacente a focos de NIP, uma vez que as células epiteliais dessas lesões pré-malignas expressam níveis aumentados de TGF- $\beta$ , fato que também foi constatado no presente estudo. Diante do exposto, a intensa reatividade do TGF- $\beta$  no estroma do grupo SEN, em oposição à fraca imunolocalização dessa molécula no grupo CP, pode estar relacionada aos diferentes estágios de reação estromal e de progressão do câncer observados nestes grupos. Cabe ressaltar que enquanto na próstata dorsolateral dos animais do grupo CP verificou-se presença difusa de adenocarcinoma bem diferenciado, e até mesmo áreas em estágio pouco diferenciado, o grupo SEN apresentou apenas focos de adenocarcinoma bem diferenciado. Assim, sugere-se que o TGF- $\beta$  estaria envolvido na ativação inicial do estroma reativo no grupo SEN, ao passo que no grupo CP a reação estromal já estaria consolidada, levando à diminuição da imunorreatividade dessa molécula.

Tuxhorn *et al.* (2002a) demonstraram a ocorrência de importantes alterações estromais no câncer de próstata em relação à condição normal. Segundo os autores, as modificações estromais caracterizaram-se pela presença de fibroblastos e miofibroblastos e simultânea redução drástica do músculo liso diferenciado, sendo este aparentemente deslocado pelo estroma reativo em desenvolvimento, o qual terminaria por englobar o foco de câncer resultando na formação do tumor (Tuxhorn *et al.*, 2002a). Assim, diferenças fundamentais no padrão de expressão de marcadores de diferenciação de células estromais foram detectadas no câncer, registrando-se acréscimo acentuado da expressão de VIM, discreta diminuição de  $\alpha$ SMA e redução quase total da expressão de calponina, um marcador de diferenciação tardia de células musculares lisas (Tuxhorn *et al.*, 2002a). Em adição, experimentos de co-localização de VIM e  $\alpha$ SMA indicaram a predominância do fenótipo de miofibroblastos no estroma reativo associado ao câncer de próstata, havendo progressivo aumento na proporção destas células durante a progressão da doença para estágios mais avançados (Tuxhorn *et al.*, 2002a). Por fim, estes autores também registraram a ocorrência de miofibroblastos e expressão aumentada de vimentina ainda no estágio de NIP, sugerindo mais uma vez a ativação local de fibroblastos periacinares em resposta a estas lesões pré-malignas (Tuxhorn *et al.*, 2002a).



Os tipos celulares precursores e os padrões espaço-temporais da indução do estroma reativo ainda são pouco conhecidos. Recentemente, San Martin *et al.* (2014) relataram a existência de uma população de fibroblastos reativos com dupla positividade para os marcadores CD34/VIM no microambiente tumoral de diversos tipos de câncer humano, inclusive na próstata, onde se registrou acréscimo dessa população celular com o avanço da doença. Paralelamente, tais células também foram identificadas no estroma reativo inicialmente recrutado por enxertos de tumores prostáticos, constituindo este o primeiro tipo celular a migrar em direção às células tumorais implantadas em camundongos imunodeficientes (San Martin *et al.*, 2014). Além disso, baseando-se na estreita relação espacial entre a microvasculatura estromal e células positivas para CD34/VIM nos diversos modelos experimentais estudados, os autores sugeriram a possível origem desse tipo celular a partir de um nicho perivascular (San Martin *et al.*, 2014). Assim, foi proposto o conceito de “microvasculatura reativa” para explicar a evolução do estroma reativo em resposta à perda da homeostase tecidual decorrente de desordens proliferativas malignas ou benignas (San Martin *et al.*, 2014). Mais ainda, estes e outros autores sugeriram que células estromais positivas para marcadores endoteliais como CD31 e CD34 podem exibir propriedades de células-tronco mesenquimais, sendo capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares estromais, como por exemplo, miofibroblastos positivos para  $\alpha$ SMA e CAFs (Zeisberg *et al.*, 2007a; Medici *et al.*, 2010; San Martin *et al.*, 2014). De fato, Zeisberg *et al.* (2007a), demonstraram que até 40% dos CAFs presentes no estroma tumoral são derivados da EndMT, sugerindo que este é um importante mecanismo de recrutamento de CAFs para a formação do estroma reativo.

A EndMT provavelmente inicia-se em resposta a sinais inflamatórios autócrinos e/ou parácrinos provenientes do tecido circundante, como o TGF- $\beta$ , ou, alternativamente, em resposta a uma injúria vascular (Potenta *et al.*, 2008). Além disso, acredita-se que este processo desempenhe papel direto durante o brotamento angiogênico, permitindo que as células situadas na extremidade do plexo vascular emergente migrem pelo tecido adjacente (Potenta *et al.*, 2008). Mais ainda, diferentes autores sugeriram que a EndMT induzida por TGF- $\beta$  também está envolvida nos processos de recrutamento de células murais, maturação e estabilização de vasos recém-formados durante a angiogênese (Armulik *et al.*, 2005; Potenta *et al.*, 2008). Desse modo, postulou-se que certos leitos vasculares, como os vasos em processo de angiogênese nos tumores, são mais suscetíveis à ocorrência de EndMT (Potenta *et al.*, 2008).

De maneira geral, sabe-se que a senescência propicia um microambiente menos favorável à angiogênese patológica e ao crescimento de tumores em relação ao observado em indivíduos jovens (Sprenger *et al.*, 2008). Entretanto, Reed *et al.* (2007) demonstraram que tumores de próstata de camundongos TRAMP podem gerar um microambiente igualmente permissivo ao crescimento tumoral e à angiogênese em indivíduos jovens e senis. De fato, sugeriu-se posteriormente que embora os níveis corporais de fatores pró-angiogênicos diminuam com a idade, sua expressão pode aumentar no microambiente de determinados órgãos, sendo a próstata um modelo ímpar dessa constatação (Sprenger *et al.*, 2008). Adicionalmente, sabe-se que o TGF- $\beta$  também possui ação pró-angiogênica, induzindo as células do estroma a expressarem níveis aumentados de fatores que promovem a proliferação, migração e formação de tubos pelas células endoteliais, como o VEGF e o FGF-2 (Tuxhorn *et al.*, 2002b; Soultziz *et al.*, 2006). Além disso, diversos modelos experimentais tanto *in vitro* como *in vivo* também têm apontado o TGF- $\beta$  como um importante mediador do processo de EndMT, tanto durante o desenvolvimento como em situações patológicas (Armstrong & Bischoff, 2004; Zeisberg *et al.*, 2007a; Zeisberg *et al.*, 2007b; Medici *et al.*, 2010). Em concordância, os presentes experimentos de co-localização sugeriram que o aumento do fator pró-angiogênico TGF- $\beta$  no microambiente prostático em animais senis relacionou-se com acréscimo das populações celulares positivas para CD34/VIM e CD34/ $\alpha$ SMA e em possível processo de EndMT, indicando a existência de estreita relação entre angiogênese, senescência e transição endotélio-mesenquimal.

Nesse sentido, evidências experimentais recentes sugerem que o envelhecimento proporciona condições favoráveis à ocorrência de EndMT (Ghosh *et al.*, 2010; Fleenor *et al.*, 2012). Ghosh *et al.* (2010) verificaram a ocorrência de fibrose cardíaca em camundongos de forma muito mais proeminente na senescência em relação a indivíduos jovens. Segundo os autores, o processo fibrótico seria decorrente da ativação espontânea da sinalização do TGF- $\beta$  através de diferentes vias no tecido miocárdico, inclusive nas células endoteliais, induzindo a ocorrência de EndMT nestas células e gerando quantidade aumentada de fibroblastos, os quais sintetizam colágeno em excesso (Ghosh *et al.*, 2010). Assim, sugeriu-se que a ocorrência de inflamação pronunciada no tecido cardíaco dos indivíduos senis em comparação aos jovens teria importante influência no processo, uma vez que a presença de células inflamatórias representaria uma fonte de citocinas pró-fibróticas, como o TGF- $\beta$  (Ghosh *et al.*, 2010). Em concordância, Fleenor *et al.* (2012) demonstraram *in vitro* que células endoteliais com fenótipo senescente são

mais suscetíveis à ocorrência de EndMT do que células consideradas jovens. Mais ainda, sugeriu-se que citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), cuja expressão está aumentada em células endoteliais tanto de humanos como de roedores senis, teriam um papel deflagrador neste processo (Fleenor *et al.*, 2012). De forma semelhante, Montico *et al.* (2014) constataram que a senescência se associou com a presença de extensos infiltrados inflamatórios no tecido prostático. Assim, baseando-se na literatura especializada e na intensa imunolocalização estromal do TGF- $\beta$  na próstata de roedores senis observada neste estudo, sugere-se que o microambiente pró-inflamatório na senescência tenha favorecido a ocorrência de EndMT na próstata durante esse período da vida.

Os presentes resultados também demonstraram que a inibição da angiogênese, seja através das drogas antiangiogênicas SU5416 e TNP-470 ou por meio da ablação androgênica com o uso de finasterida, resultou em diminuição da intensidade de colocalização de CD34/ $\alpha$ SMA e CD34/VIM no estroma prostático de animais senis. Tal fato indicou não apenas a redução da rede microvascular, mas também da frequência de ocorrência de EndMT no compartimento estromal, sendo que este efeito ocorreu com intensidade variável nos diferentes grupos experimentais. Além disso, considerando as ações promotoras da angiogênese do TGF- $\beta$ , seria esperado que o tratamento com drogas antiangiogênicas resultasse em diminuição da intensidade de imunolocalização dessa molécula, observação que foi registrada nos presentes resultados, sobretudo frente à combinação dos inibidores direto e indireto. Por outro lado, verificou-se que nos grupos tratados com finasterida a expressão do TGF- $\beta$  manteve-se praticamente inalterada em relação aos senis, fato que poderia explicar a manutenção do fenótipo de estroma reativo nestes animais, com presença de miofibroblastos e níveis aumentados de VIM e  $\alpha$ SMA.

É fato conhecido que diversos fatores podem interagir com a via de sinalização do TGF- $\beta$  na mediação do processo de EndMT, dentre eles o VEGF (Armstrong & Bischoff, 2004; Paruchuri *et al.*, 2006; Potenta *et al.*, 2008; Medici & Kalluri, 2012). Sabe-se que esse fator pró-angiogênico atua sobre as células estimulando a manutenção do seu fenótipo endotelial, sendo assim capaz de antagonizar as ações promotoras de transformação mesenquimal do TGF- $\beta$ , ainda que em amplitude limitada (Paruchuri *et al.*, 2006). Assim, tem sido sugerido que o VEGF, sinalizando através do receptor VEGFR2, tenha ação inibitória sobre o processo de EndMT, embora os mecanismos dessa inibição ainda não estejam esclarecidos (Paruchuri *et al.*, 2006; Medici *et al.*, 2010; Medici & Kalluri, 2012). O SU5416 é um composto sintético antiangiogênico cuja ação ocorre por

inibição da ativação do VEGFR2 na presença do VEGF (Fong *et al.*, 1999). Nesse sentido, seria esperado que a inibição deste receptor, o qual atua como inibidor da EndMT, resultasse na estimulação desse processo. Entretanto, este estudo registrou que o tratamento com SU5416 levou à menor frequência de imunolocalização de células positivas para CD34/ $\alpha$ SMA e CD34/VIM, indicando assim que houve diminuição da ocorrência de EndMT. De acordo com Haroon *et al.* (2002), o SU5416 foi capaz de inibir a atividade de uma classe de enzimas essencial para a ativação do TGF- $\beta$ , reduzindo em 90% os níveis de TGF- $\beta$  ativado e levando ao retardo de processos envolvidos no reparo tecidual e cicatrização. Além disso, Armstrong & Bischoff (2004) indicaram a existência de um intervalo fisiológico dentro do qual o VEGF é capaz de estimular a EndMT. Quando os níveis de VEGF estão elevados, há manutenção do fenótipo das células endoteliais, impedindo que a ocorrência de EndMT nas mesmas (Armstrong & Bischoff, 2004). Por outro lado, sob níveis muito reduzidos de VEGF, as células endoteliais não proliferam suficientemente, de modo que há um déficit na quantidade de células aptas a sofrer EndMT (Armstrong & Bischoff, 2004). Assim, sugere-se que a redução da ativação do TGF- $\beta$ , os baixos níveis de VEGF decorrentes do bloqueio de seu receptor, ou ainda uma combinação desses fatores tenham levado à diminuição da ocorrência de EndMT após o tratamento com SU5416.

Diversos estudos demonstraram o antagonismo existente entre as vias de sinalização ativadas por andrógenos e pelo TGF- $\beta$  (Gerdes *et al.*, 1998; Lucia *et al.*, 1998; Soultziz *et al.*, 2006). Em condições normais, os andrógenos estimulam o crescimento do epitélio prostático exercendo efeito inibitório sobre a expressão de TGF- $\beta$  (Lucia *et al.*, 1998; Soultziz *et al.*, 2006). Em concordância, verificou-se que a ablação androgênica através do tratamento com finasterida levou ao acréscimo da apoptose de células epiteliais em decorrência da estimulação das vias de sinalização envolvendo esta molécula (Lucia *et al.*, 1998; Sáez *et al.*, 1998). O TGF- $\beta$ , por sua vez, atua como inibidor do crescimento do órgão, sendo liberado pelas células estromais e exercendo ação parácrina sobre o epitélio, onde induz apoptose mesmo na presença de níveis fisiológicos de andrógenos (Wikström *et al.*, 1998; Reynolds & Kyprianou, 2006). Paradoxalmente, nas neoplasias prostáticas, o TGF- $\beta$  encontra-se superexpresso, tanto no epitélio como no estroma (Tuxhorn *et al.*, 2002a; Kawada *et al.*, 2008). Entretanto, de acordo com Soultziz *et al.* (2006), houve diminuição da expressão de TGF- $\beta$  no câncer de próstata, fato que os autores atribuíram à dependência androgênica das amostras neoplásicas analisadas. Em adição, linhagens celulares de câncer prostático tratadas com finasterida

apresentaram aumento da expressão gênica de TGF- $\beta$  independentemente de sua dependência androgênica, sugerindo também efeitos diretos desta droga sobre a expressão do TGF- $\beta$  (Das *et al.*, 2010). Assim, considerando os presentes resultados e os registros da literatura, é possível que os focos de adenocarcinoma do grupo CP ainda estejam em um estágio andrógeno-dependente, o que inibiria a expressão de TGF- $\beta$  nessas lesões neoplásicas. Por outro lado, nos grupos FIN e STF, o aumento da reatividade do TGF- $\beta$  pode ser decorrente do bloqueio da sinalização androgênica na glândula por ação da finasterida ou mesmo de uma ação direta desta droga sobre a expressão de TGF- $\beta$ . Entretanto, ao contrário do que seria esperado, a elevada expressão de TGF- $\beta$  nos grupos tratados com finasterida não se associou com maior frequência de células positivas para CD34/ $\alpha$ SMA e CD34/VIM indicativas do desenvolvimento de um microambiente estromal reativo a partir da microvasculatura prostática. Apesar disso, a expressão aumentada de VIM e  $\alpha$ SMA nesses grupos, bem como a detecção de células estromais com fenótipo de miofibroblastos, sugere que o TGF- $\beta$  continua atuando na indução do estroma reativo no órgão, possivelmente através de vias alternativas à EndMT, visto que a finasterida levaria à inibição desse processo em decorrência do bloqueio da angiogênese no órgão.

As lectinas têm sido úteis no estudo de glicoconjugados da próstata em condições normais bem como na detecção de alterações dessas moléculas associadas com hiperplasias, displasias e neoplasias prostáticas, tanto em humanos como em roedores (Chan *et al.*, 2001). Embora anticorpos monoclonais sejam mais específicos, as lectinas detectam resíduos de carboidratos e sequências de oligossacarídeos que os anticorpos podem não reconhecer (Chan *et al.*, 2001). A lectina GSL-1 tem sido utilizada em diversos estudos como um marcador de células endoteliais murinas (Clavel *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007), tendo sido empregada neste estudo com a mesma finalidade. Contudo, foi verificado que essa molécula não demonstrou a especificidade esperada para vasos sanguíneos, sendo que em alguns casos, como nos grupos NIP e CP, a GSL-1 apresentou positividade também no epitélio secretor. De acordo com Chan *et al.* (2001), o padrão de glicosilação de células epiteliais da próstata lateral de roedores é fundamentalmente diferente sob condições de normalidade, de lesões pré-malignas similares a NIP ou de tumores. Nesse sentido, estes autores registraram que a GSL-1 foi especificamente expressa em vasos sanguíneos e células epiteliais basais da próstata normal, sendo que a positividade nestas células não foi verificada em lesões displásicas semelhantes à NIP (Chan *et al.*, 2001). Entretanto, a imunorreatividade da GSL-1 foi

novamente detectada em certos tipos celulares de tumores prostáticos (Chan *et al.*, 2001). Estes achados indicaram que o processamento de glicoconjugados ocorre de maneiras distintas de acordo com os diferentes estágios de progressão de lesões prostáticas, sugerindo uma possível explicação para os diferentes padrões de imunolocalização da GSL-1 neste estudo.

Em suma, este estudo demonstrou que, similarmente ao verificado em camundongos TRAMP, a senescência associou-se ao desenvolvimento de um microambiente de estroma reativo associado a lesões malignas na próstata de roedores. Tal fenótipo reativo caracterizou-se por aumento de TGF- $\beta$ , VIM e  $\alpha$ SMA bem como por evidente co-localização dos marcadores endotélio-mesenquimais CD34/VIM e CD34/ $\alpha$ SMA, indicando a estimulação do processo de EndMT. Em adição, a recuperação das alterações estromais em diferentes graus mediante o tratamento anti-angiogênico evidenciou a contribuição da neovascularização para o recrutamento de células estromais de fenótipo ativado na próstata do indivíduo senil, corroborando a hipótese da microvasculatura reativa. Apesar disso, o tratamento com finasterida demonstrou que outros mecanismos de indução mediados pelo TGF- $\beta$ , além da EndMT, podem constituir vias alternativas para o desenvolvimento do estroma reativo em um microambiente desfavorável à angiogênese, indicando uma ação dicotômica dessa droga sobre a dinâmica prostática. Por fim, os presentes resultados apontaram, de maneira inédita, que a combinação dos fatores senescência, angiogênese e EndMT constitui potente fator contribuinte para o desenvolvimento de um microambiente reativo promotor de malignidades prostáticas a partir do compartimento microvascular.

## 6.6. ANEXOS

**Tabela 1.** Distribuição da imunorreatividade do fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ), da vimentina (VIM) e da  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) na próstata dorsolateral de camundongos dos grupos experimentais.

Moléculas	Compartimentos glandulares	Grupos Experimentais								
		JV	NIP	CP	SEN	SU	TNP	ST	FIN	STF
TGF- $\beta$	Epitélio	2	3	1	0	1	2	1	2	3
	Estroma	1	1	1	3	2	1	1	3	2
VIM	Epitélio	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Estroma	1	2	3	3	1	3	1	2	3
$\alpha$ SMA	Epitélio	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Estroma	2	3	3	3	1	3	1	2	3

**Tabela 2.** Distribuição das co-localizações de CD34/ $\alpha$ SMA e CD34/VIM na próstata dorsolateral de camundongos dos diferentes grupos experimentais. A reatividade foi graduada em uma escala de 0-3 com base na avaliação qualitativa da área positiva para cada par de antígenos, sendo: 0 = ausente; 1 = fraca; 2 = moderada; e 3 = intensa.

Co-localização	Grupos Experimentais								
	JV	NIP	CP	SEN	SU	TNP	ST	FIN	STF
CD34/ $\alpha$ SMA	1	1	2	3	1	2	2	1	1
CD34/VIM	1	2	3	3	1	2	1	1	-

**Figura 1.** Imunolocalização do fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ) na próstata dorsolateral de camundongos dos grupos experimentais. A) Grupo Controle Jovem (JV); B) Grupo Controle NIP (NIP); C) Grupo Controle Câncer (CP); D) Grupo Senil (SEN); E) Grupo SU5416 (SU); F) Grupo TNP-470 (TNP); G) Grupo SU5416 + TNP-470 (ST); H) Grupo Finasterida (FIN); I) Grupo SU5416 + TNP-470 + Finasterida (STF). Pontos de imunolocalização positiva no epitélio e no estroma estão indicados por setas e asteriscos, respectivamente. Ep: epitélio; St: estroma; L: lúmen.

**Figura 2.** Imunolocalização da vimentina (A, C, E, G) e da  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) (B, D, F, H) na próstata dorsolateral de camundongos dos grupos experimentais. A-B) Grupo Controle Jovem (JV); C-D) Grupo Controle NIP (NIP); E-F) Grupo Controle Câncer (CP); G-H) Grupo Senil (SEN). Pontos de imunolocalização positiva para vimentina e  $\alpha$ SMA estão indicados por setas e asteriscos, respectivamente. Quando presentes, as cabeças de seta indicam pontos de co-expressão desses marcadores correspondentes a miofibroblastos. Ep: epitélio; St: estroma; L: lúmen.

**Figura 3.** Imunohistoquímica para CD34/ $\alpha$ SMA, CD34/VIM e GSL-1 na próstata dorsolateral de animais do grupo Controle Jovem (JV). A) e D) A co-localização de CD34/ $\alpha$ SMA no estroma glandular apresentou positividade fraca, sobretudo em células componentes de vasos sanguíneos (cabeças de seta pretas). B) e E) Células positivas para CD34/VIM foram detectadas com intensidade fraca, sendo a maioria delas parte integrante de vasos sanguíneos (cabeças de seta pretas). C) A imunorreatividade da GSL-1 demonstrou a presença de delgada rede microvascular circundando os ácinos (cabeças de seta pretas). F) e I) Presença de células positivas somente para CD34/ $\alpha$ SMA (cabeças de seta pretas) ou também para vimentina (cabeças de seta brancas). G) e J) Células estromais com positividade para CD34/VIM isoladamente (cabeças de seta pretas) ou em associação com a  $\alpha$ SMA (cabeças de seta brancas). H) Ausência de reatividade de GSL-1 em pontos de co-localização de CD34/ $\alpha$ SMA ou CD34/VIM (cabeças de seta pretas), indicando que as células duplamente positivas das figuras I e J não são componentes de vasos sanguíneos. Ep: epitélio; St: estroma; Vs: vasos sanguíneos.

**Figura 4.** Imunohistoquímica para CD34/ $\alpha$ SMA, CD34/VIM e GSL-1 na próstata dorsolateral de animais dos grupos Controle NIP (A-E) e Controle Câncer (F-J). Grupo Controle NIP (NIP): A) e D) Co-localização de intensidade fraca para CD34/ $\alpha$ SMA no estroma glandular (cabeças de seta pretas). B) e E) Células com dupla positividade para CD34/VIM foram detectadas com intensidade moderada (cabeças de seta pretas). C) Ausência de especificidade da imunohistoquímica para GSL-1, a qual demonstrou marcação também no epitélio secretor (setas). Presença de foco de NIP (cabeças de seta brancas). Grupo Controle Câncer (CP): F) e I) Imunorreatividade moderada para CD34/ $\alpha$ SMA no compartimento estromal (cabeças de seta pretas). Notar a presença de foco de adenocarcinoma (cabeças de seta brancas). G) e J) Células positivas para



CD34/VIM foram muito frequentes, caracterizando co-localização intensa desses marcadores (cabeças de seta pretas). Ruptura da membrana basal, indicando foco de adenocarcinoma (cabeças de seta brancas). H) Assim como no grupo NIP, a GSL-1 não apresentou reatividade específica para células endoteliais, sendo também detectada no epitélio (setas). Ep: epitélio; St: estroma; Vs: vasos sanguíneos.

**Figura 5.** Imunohistoquímica para CD34/ $\alpha$ SMA, CD34/VIM e GSL-1 na próstata dorsolateral de animais do grupo Senil (SEN). A) e B) Extensa faixa de dupla positividade para CD34/ $\alpha$ SMA, caracterizando imunorreatividade intensa para esses marcadores no estroma prostático (cabeças de seta pretas). C) e D) Intensa co-localização de CD34/VIM ao redor de um ácino glandular hiperplásico (cabeças de seta pretas). E) Imunohistoquímica para GSL-1 demonstrando que a maioria dos pontos de co-localização da figura D representam uma extensa rede de microvasos dispostos ao redor do ácino hiperplásico (cabeças de seta pretas). F) e G) Presença de células estromais positivas para CD34/VIM nas proximidades de um vaso sanguíneo (cabeças de seta pretas). H) e I) Ocorrência de células positivas para vimentina (cabeças de seta brancas) ou para CD34/VIM (cabeças de seta pretas) entre as células epiteliais em um foco de adenocarcinoma prostático. Ep: epitélio; St: estroma; Vs: vasos sanguíneos.

**Figura 6.** Imunolocalização da vimentina (A, C, E) e da  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) (B, D, F) na próstata dorsolateral de camundongos dos grupos experimentais. A-B) Grupo SU5416 (SU); C-D) Grupo TNP-470 (TNP); E-F) Grupo SU5416 + TNP-470 (ST). Pontos de imunolocalização positiva para vimentina e  $\alpha$ SMA estão indicados por setas e asteriscos, respectivamente. Quando presentes, as cabeças de seta indicam pontos de co-expressão desses marcadores correspondentes a miofibroblastos. Ep: epitélio; St: estroma; L: lúmen.

**Figura 7.** Imunohistoquímica para CD34/ $\alpha$ SMA, CD34/VIM e GSL-1 na próstata dorsolateral de animais do grupo SU5416 (SU). A) e D) Fraca imunolocalização de células com dupla positividade para CD34/ $\alpha$ SMA (cabeças de seta pretas). B) e E) A co-localização de CD34/VIM também foi detectada com intensidade fraca (cabeças de seta pretas). C) Presença de reduzida quantidade de microvasos no estroma em relação ao grupo SEN, os quais quase sempre coincidem com pontos de dupla marcação (cabeças de seta pretas). F) e I) Região com menor grau de recuperação glandular, demonstrando

epitélio hiperplásico e moderada intensidade de co-localização de CD34/ $\alpha$ SMA (cabeças de seta pretas). G) e J) A imunorreatividade de CD34/VIM, entretanto, caracterizou-se como fraca também nessas regiões (cabeças de seta pretas). H) Presença de microvasos de calibre reduzido coincidindo com pontos de co-localização de CD34/ $\alpha$ SMA ou CD34/VIM (cabeças de seta pretas). Ep: epitélio; St: estroma.

**Figura 8.** Imunohistoquímica para CD34/ $\alpha$ SMA, CD34/VIM e GSL-1 na próstata dorsolateral de animais dos grupos TNP-470 (A-E) e SU5416 + TNP-470 (F-J). Grupo TNP-470 (TNP): A) e C) A dupla marcação de CD34/ $\alpha$ SMA foi detectada com intensidade moderada nas células estromais (cabeças de seta pretas). B) e D) Similarmente, a co-localização de CD34/VIM também se caracterizou como moderada (cabeças de seta preta). Grupo SU5416 + TNP-470 (ST): E) e H) Células com dupla positividade para CD34/ $\alpha$ SMA foram detectadas no estroma prostático com intensidade moderada (cabeças de seta pretas). F) e I) A dupla marcação de CD34/VIM foi caracterizada como fraca (cabeças de seta pretas). G) A ausência de positividade de GSL-1 em regiões de dupla marcação demonstrou que algumas das células positivas para CD34/ $\alpha$ SMA e CD34/VIM não eram componentes de vasos sanguíneos (cabeças de seta pretas). Ep: epitélio; St: estroma; Vs: vasos sanguíneos.

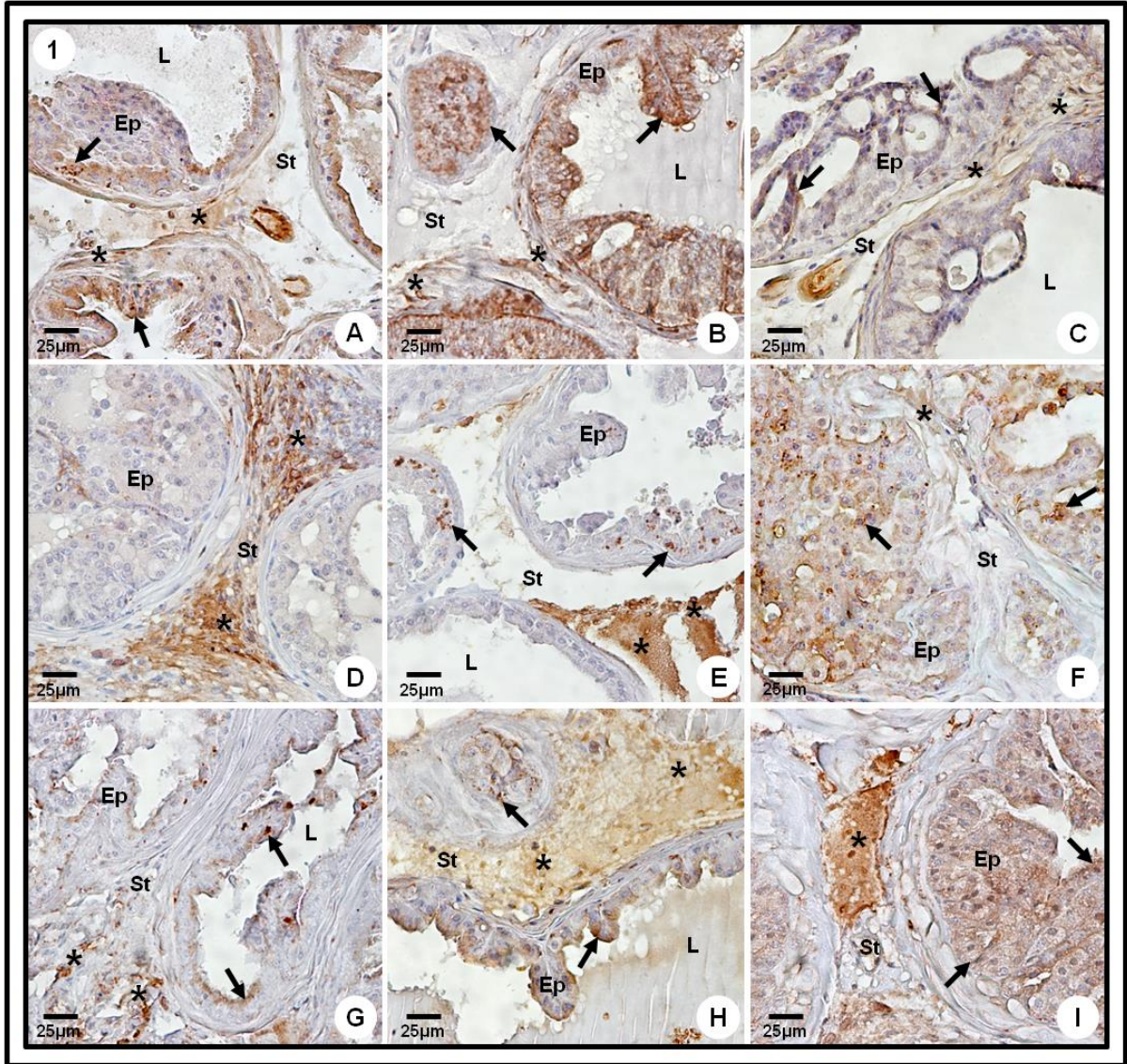
**Figura 9.** Imunolocalização da vimentina (A, C) e da  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) (B, D) na próstata dorsolateral de camundongos dos grupos experimentais. A-B) Grupo Finasterida (FIN); C-D) Grupo SU5416 + TNP-470 + Finasterida (STF). Pontos de imunolocalização positiva para vimentina e  $\alpha$ SMA estão indicados por setas e asteriscos, respectivamente. Quando presentes, as cabeças de seta indicam pontos de co-expressão desses marcadores correspondentes a miofibroblastos. Ep: epitélio; St: estroma.

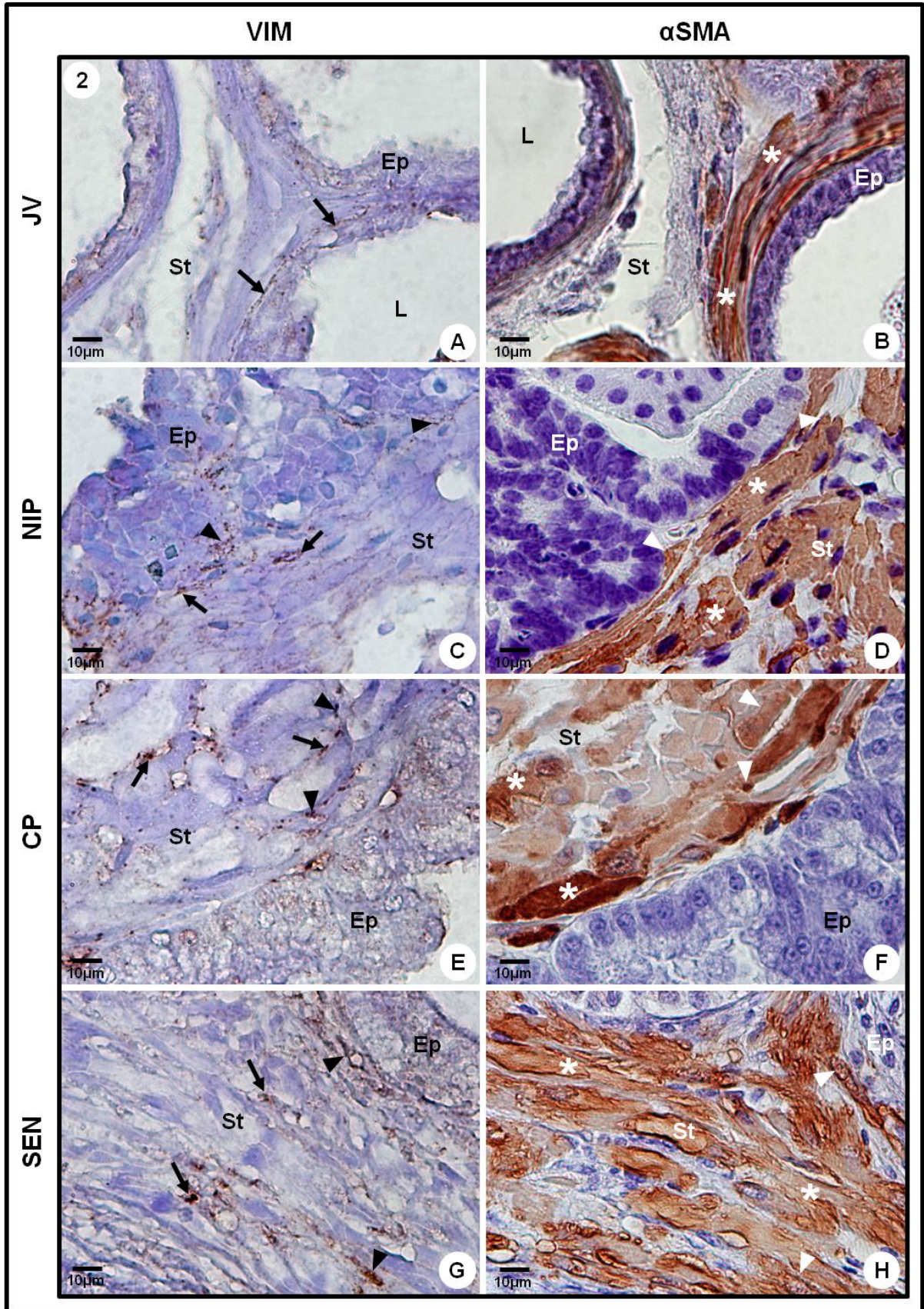
**Figura 10.** Imunohistoquímica para CD34/ $\alpha$ SMA, CD34/VIM e GSL-1 na próstata dorsolateral de animais dos grupos Finasterida (A-E) e SU5416 + TNP-470 + Finasterida (F-H). Grupo Finasterida (FIN): A) e D) A dupla marcação de CD34/ $\alpha$ SMA foi classificada como fraca (cabeças de seta pretas). B) e E) Células com dupla positividade para CD34/VIM também foram raras, caracterizando imunolocalização de intensidade fraca (cabeças de seta pretas). C) A imunohistoquímica para GSL-1 demonstrou a presença ao redor dos ácinos de delgada rede de microvasos, os quais coincidiram com os raros pontos de dupla marcação para CD34/ $\alpha$ SMA ou CD34/VIM (cabeças de seta pretas).

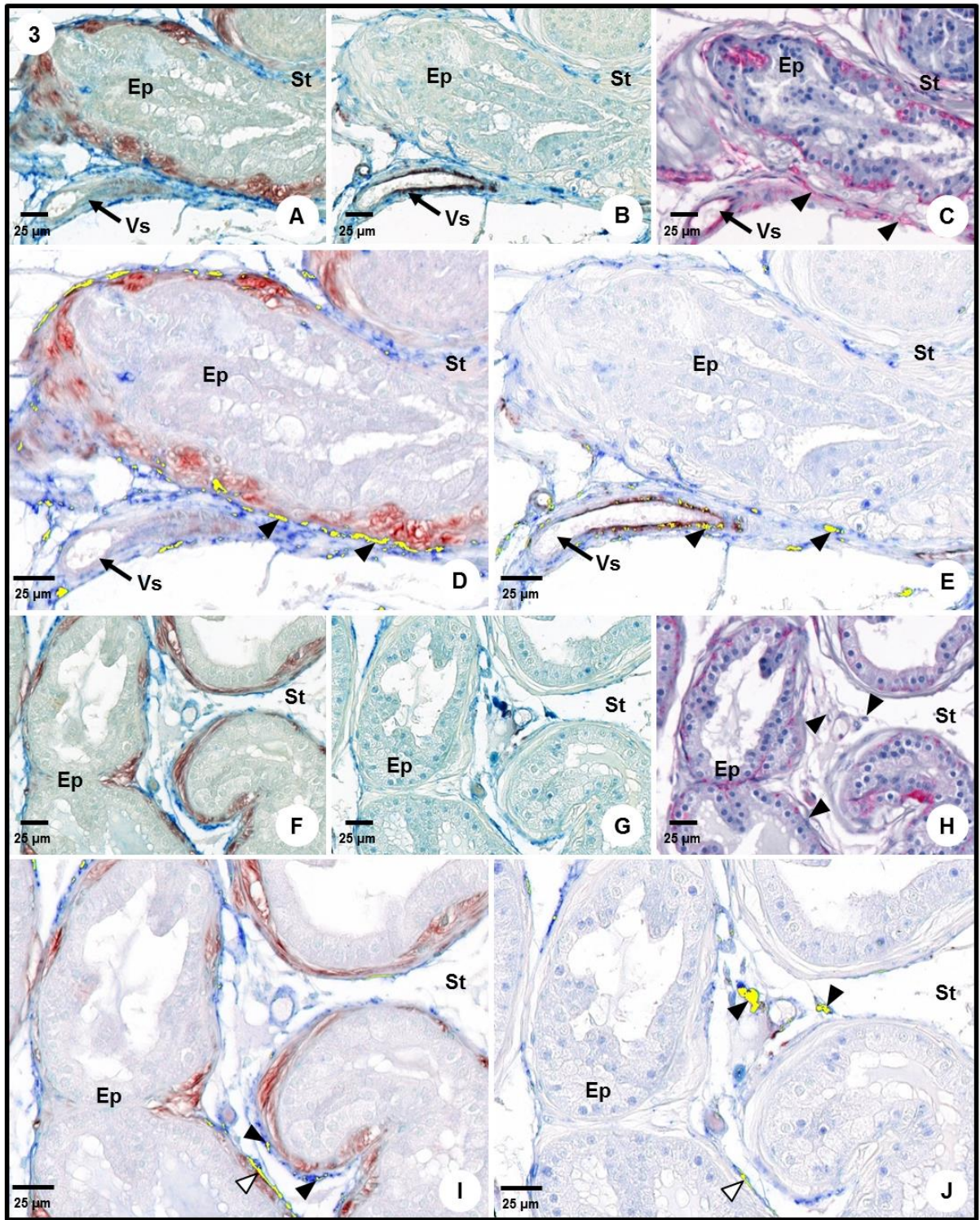
Grupo SU5416 + TNP-470 + Finasterida (STF): F) e G) Fraca co-localização de CD34/ $\alpha$ SMA no estroma prostático (cabeças de seta pretas). Ep: epitélio; St: estroma.

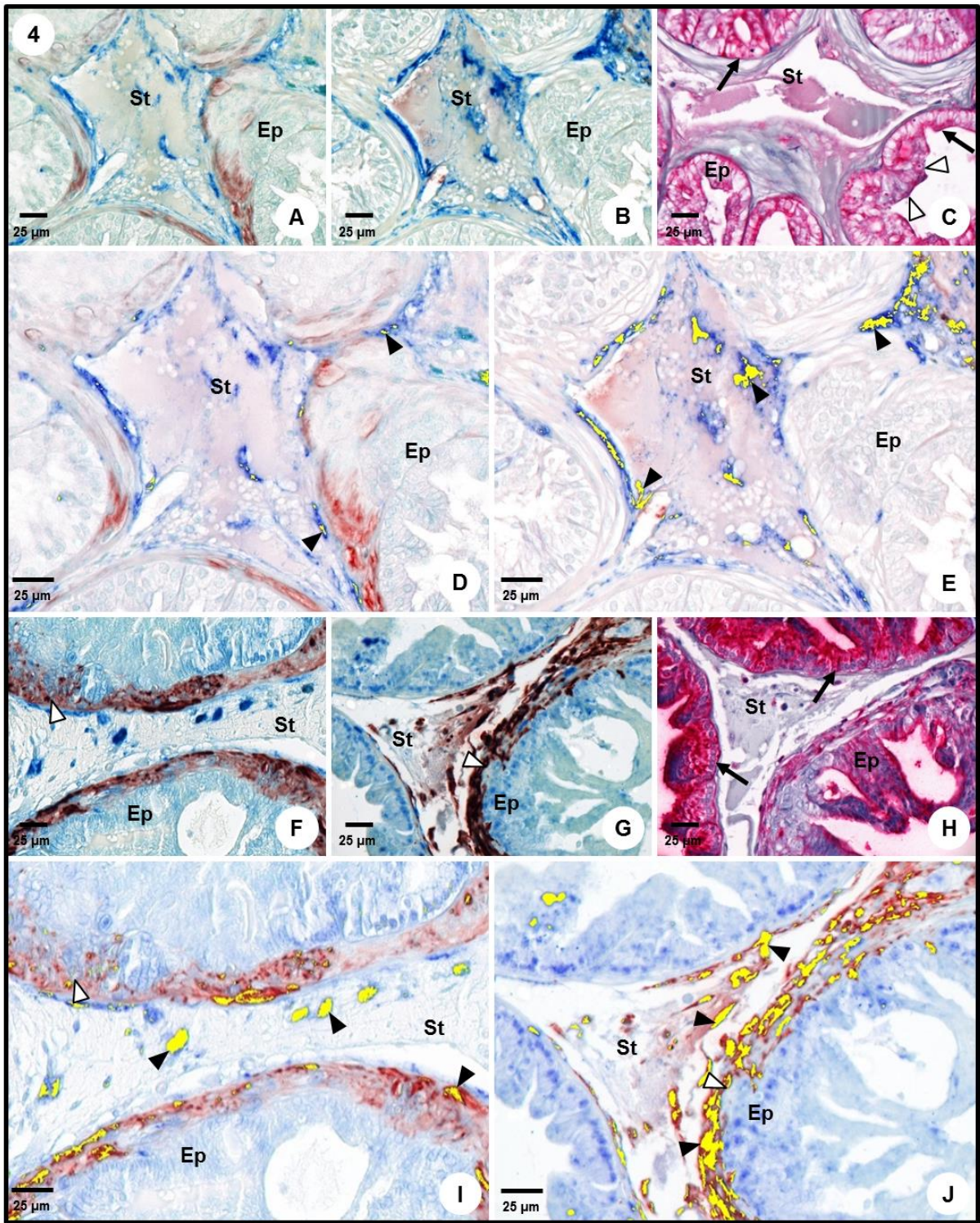
**Figura 11.** Quantificação por Western blotting dos níveis proteicos do fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ), da vimentina e da  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) na próstata dorsolateral de camundongos dos grupos experimentais. Os valores estão expressos como a porcentagem média  $\pm$  desvio padrão em relação ao controle endógeno  $\beta$ -actina. Letras distintas nas barras do gráfico indicam diferença estatística significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

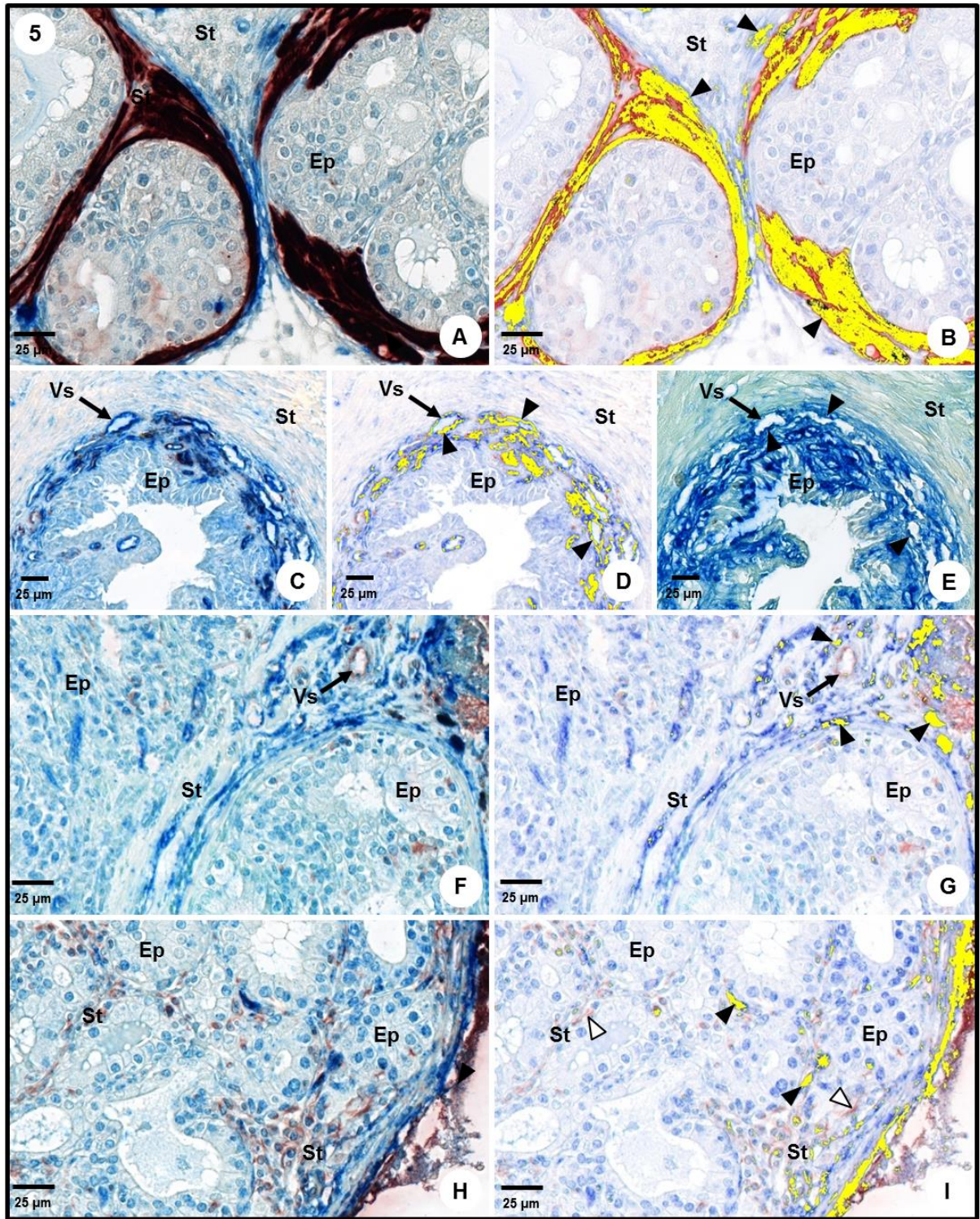
**Figura 12.** Escala proposta neste estudo para gradação da reação estromal com base na co-localização de CD34/ $\alpha$ SMA e suas possíveis relações com o desenvolvimento de lesões prostáticas. A) e B) No grau 1, raros pontos de dupla positividade para CD34/ $\alpha$ SMA são observados, caracterizando co-localização de intensidade fraca. Trata-se de um estroma quiescente, não reativo, como observado no grupo JV. C) e D) No grau 2, a dupla marcação para esses marcadores é moderada, indicando um grau intermediário de estroma reativo, que estaria associado à ocorrência de adenocarcinoma já instalado, como verificado no grupo CP. E) e F) No grau 3, o qual se associa com intensa co-localização de CD34/ $\alpha$ SMA, a reação estromal é bastante pronunciada e poderia estar relacionada aos primeiros estágios da carcinogênese durante a senescência, conforme observado no grupo SEN. Ep: epitélio; St: estroma; Vs: vasos sanguíneos.



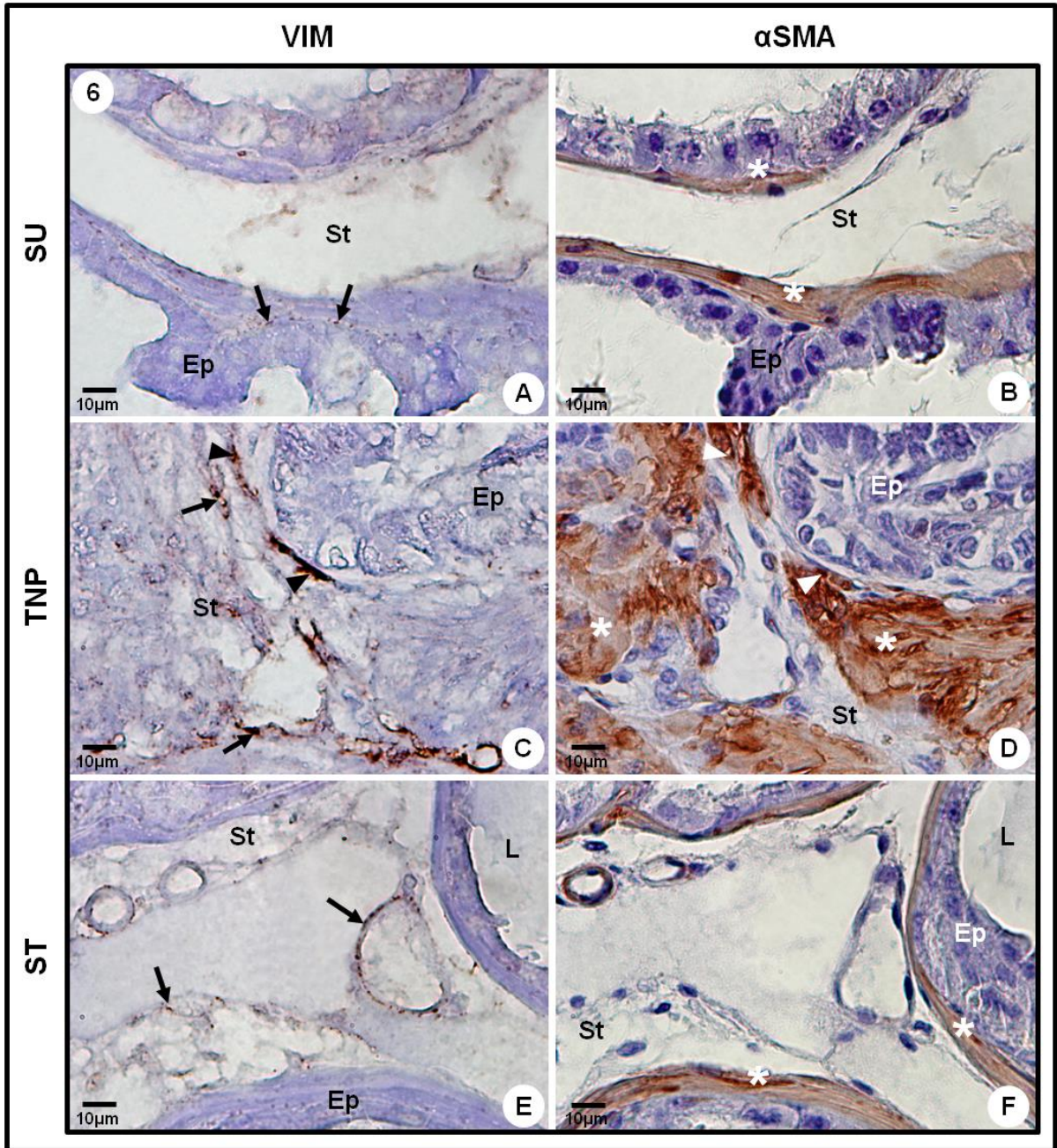




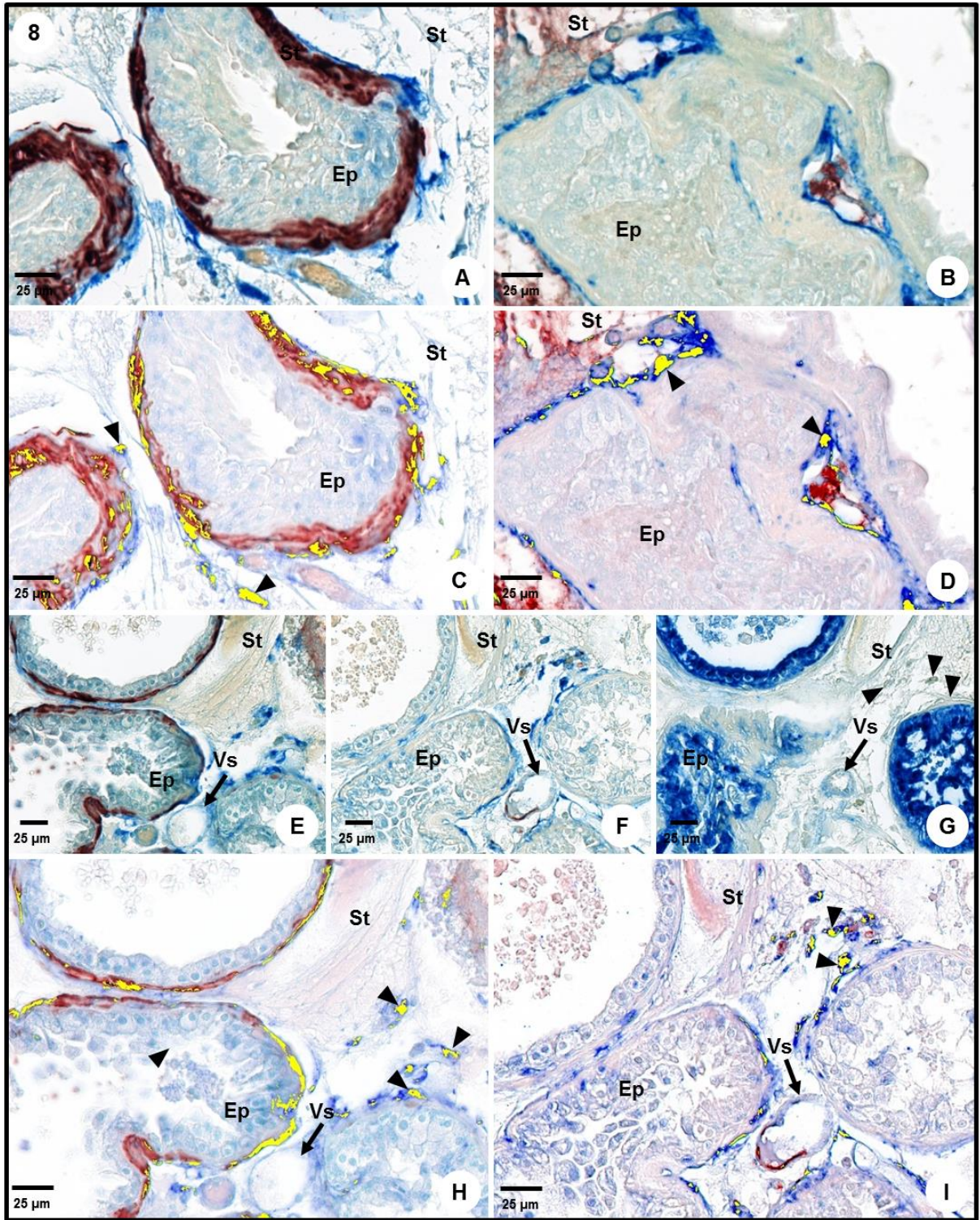


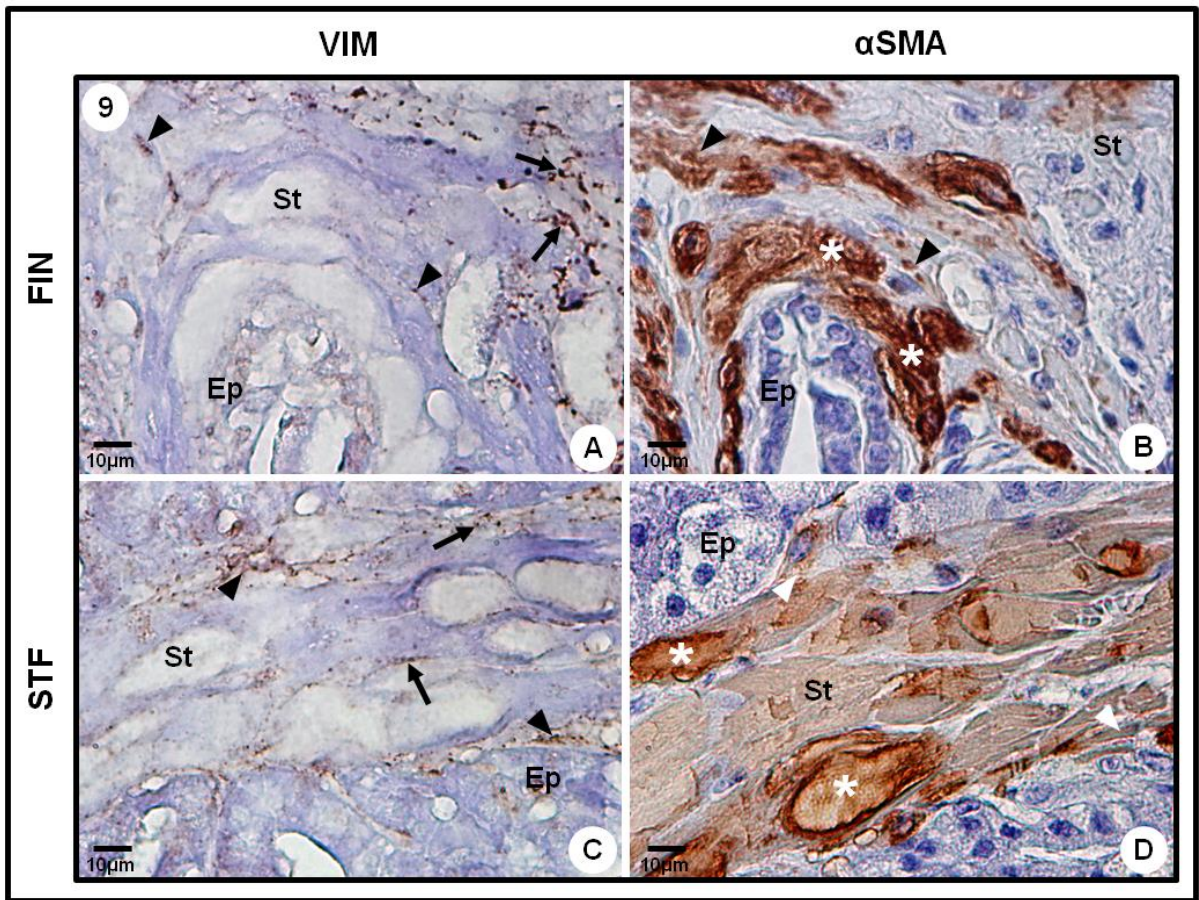




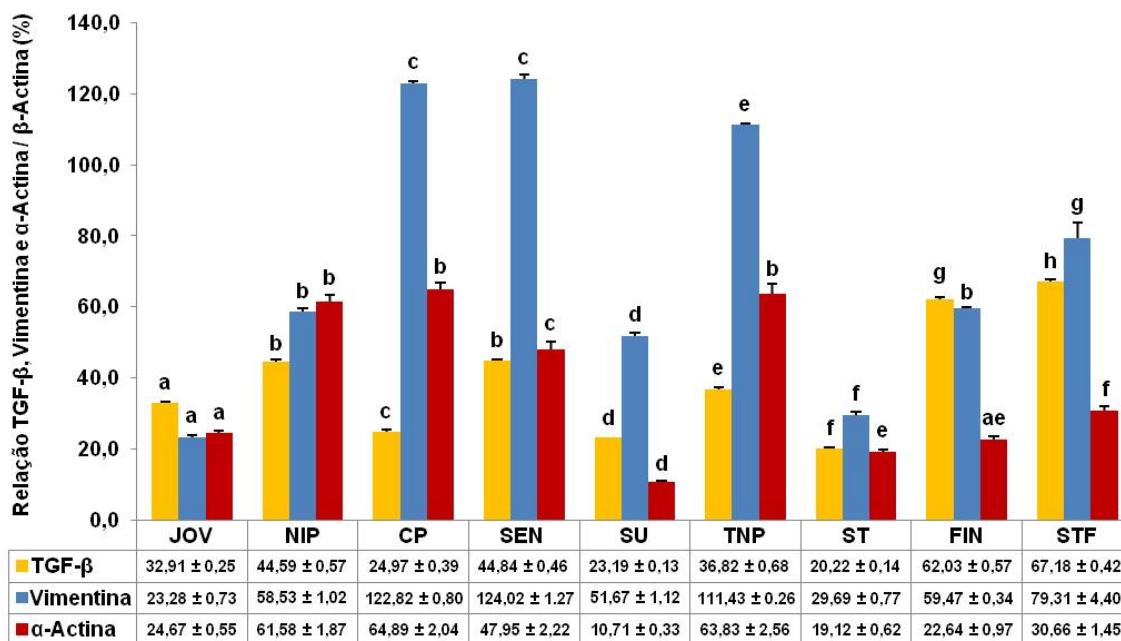
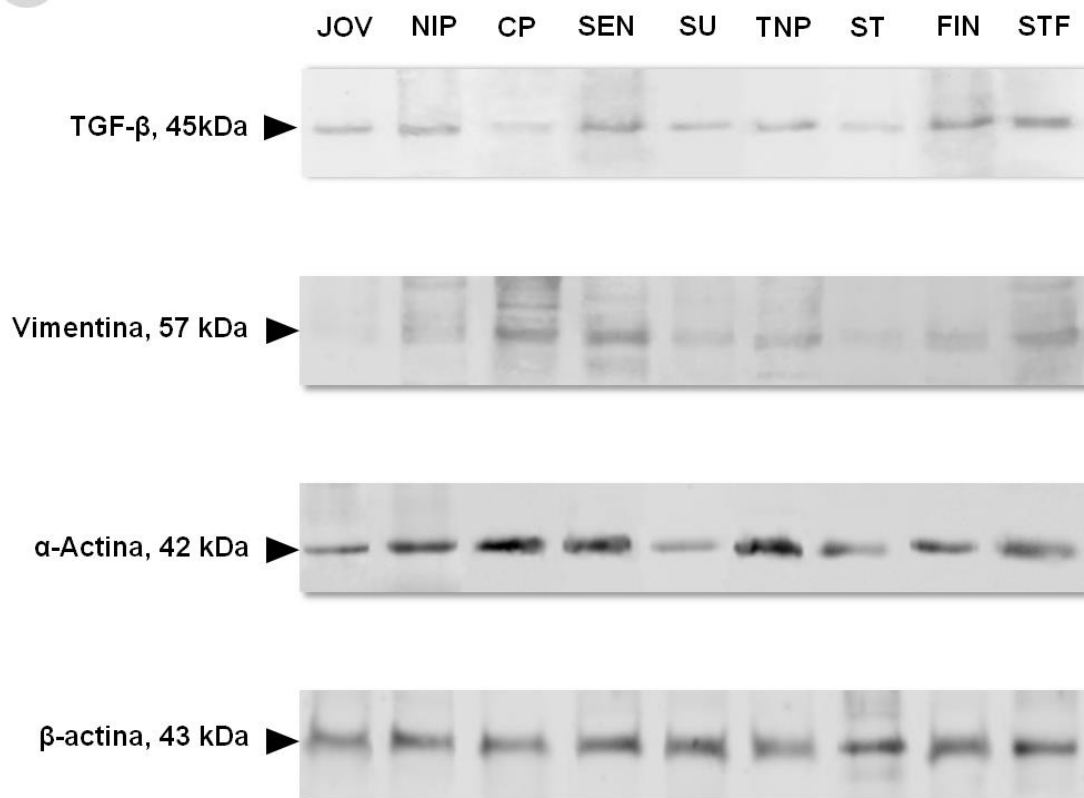




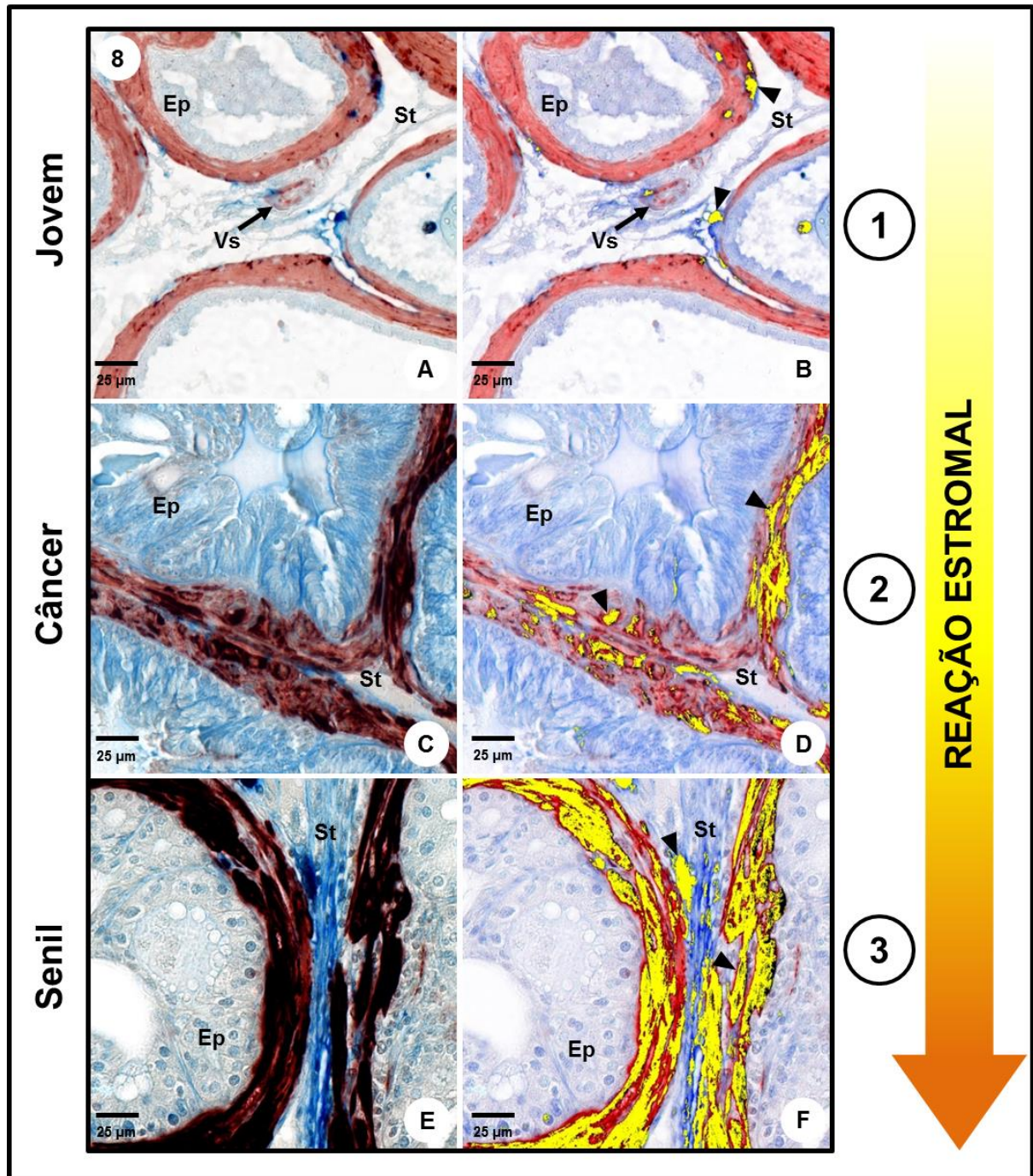








Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos ( $P < 0,05$ ).



## 6.7. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2010/51112-5, 2011/01968-3 and 2012/03010-4).

## 6.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG, E.J. & BISCHOFF, J. 2004. Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res* 95(5): 459-470.
- ARMULIK, A., ABRAMSSON, A. & BETSHOLTZ, C. 2005. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 97(6): 512-523.
- BARRON, D.A. & ROWLEY, D.R. 2012. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer* 19(6): R187-R204.
- CAMPISI, J. 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120(4): 513-522.
- CHAN, F.L., CHOI, H.L. & HO, S.M. 2001. Analysis of glycoconjugate patterns of normal and hormone-induced dysplastic Noble rat prostates, and an androgen-independent Noble rat prostate tumor, by lectin histochemistry and protein blotting. *Prostate* 46(1): 21-32.
- CIRRI, P. & CHIARUGI, P. 2011. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res* 1(4): 482-497.
- CLAVEL, G., VALVASON, C., YAMAOKA, K., LEMEITER, D., LAROCHE, L., BOISSIER, M.C. & BESSIS, N. 2006. Relationship between angiogenesis and inflammation in experimental arthritis. *Eur Cytokine Netw* 17(3): 202-210.
- COPPÉ, J.P., KAUSER, K., CAMPISI, J. & BEAUSÉJOUR, C.M. 2006. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem*. 281(40): 29568-29574.
- DAS, K., LORENA, P.D., NG, L.K., LIM, D., SHEN, L., SIOW, W.Y., TEH, M., REICHARDT, J.K. & SALTO-TELLEZ, M. 2010. Differential expression of steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes and association with disease severity and angiogenic genes predict their biological role in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 17(3): 757-770.
- ELENBAAS, B. & WEINBERG, R.A. 2001. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res* 264(1): 169-184.
- FLEENOR, B.S., MARSHALL, K.D., RIPPE, C. & SEALS, D.R. 2012. Replicative aging induces endothelial to mesenchymal transition in human aortic endothelial cells: potential role of inflammation. *J Vasc Res* 49(1): 59-64.
- FONG, T.A., SHAWVER, L.K., SUN, L., TANG, C., APP, H., POWELL, T.J., KIM, Y.H., SCHRECK, R., WANG, X., RISAU, W., ULLRICH, A., HIRTH, K.P. & McMAHON, G. 1999. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 59(1): 99-106.
- GERDES, M.J., LARSEN, M., McBRIDE, L., DANG, T.D., LU, B. & ROWLEY, D.R. 1998. Localization of transforming growth factor-beta-1 and type II receptor in developing normal human prostate and carcinoma tissues. *J Histochem Cytochem*. 46(3): 379-388.
- GONZALES, G.F., GASCO, M., MALHEIROS-PEREIRA, A. & GONZALES-CASTAÑEDA, C. 2008. Antagonistic effect of *Lepidium meyenii* (red maca) on prostatic hyperplasia in adult mice. *Andrologia* 40(3): 179-185.



- GHOSH, A.K., BRADHAM, W.S., GLEAVES, L.A., DE TAEVE, B., MURPHY, S.S., COVINGTON, J.W. & VAUGHAN, D.E. 2010. Genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 promotes cardiac fibrosis in aged mice: involvement of constitutive transforming growth factor-beta signaling and endothelial-to-mesenchymal transition. *Circulation* 122(12): 1200-1209.
- HAROON, Z.A., AMIN, K., SAITO, W., WILSON, W., GREENBERG, C.S. & DEWHIRST, M.W. 2002. SU5416 delays wound healing through inhibition of TGF-beta 1 activation. *Cancer Biol Ther.* 1(2): 121-126.
- KALLURI, R. & ZEISBERG, M. 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6(5): 392-401.
- KAWADA, M., INOUE, H., ARAKAWA, M. & IKEDA, D. 2008. Transforming growth factor-beta1 modulates tumor-stromal cell interactions of prostate cancer through insulin-like growth factor-I. *Anticancer Res.* 28(2A): 751-730.
- LUCIA, M.S., SPORN, M.B., ROBERTS, A.B., STEWART, L.V. & DANIELPOUR, D. 1998. The role of transforming growth factor-beta1, -beta2, and -beta3 in androgen-responsive growth of NRP-152 rat prostatic epithelial cells. *J Cell Physiol* 175(2): 184-192.
- MATSUSAKA, S., NAKASHO, K., TERADA, N., SUGIHARA, A., TSUJIMURA, T., TAKANASHI, T., UEMATSU, K., OKAMOTO, E. & TOYOSAKA, A. 2000. Inhibition by an angiogenesis inhibitor, TNP-470, of the growth of a human hepatoblastoma heterotransplanted into nude mice. *J Pediatr Surg.* 35(8): 1198-1204.
- MEDICI, D. & KALLURI, R. 2012. Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype. *Semin Cancer Biol* 22(5-6): 379-384.
- MEDICI, D., SHORE, E.M., LOUNEY, V.Y., KAPLAN, F.S., KALLURI, R. & OLSEN, B.R. 2010. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med* 16(12): 1400-1406.
- MONTGOMERY, D.C. 1991. Design and Analysis of Experiments, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.
- MONTICO, F., KIDO, L.A., HETZL, A.C., LORENCINI, R.M., CÂNDIDO, E.M. & CAGNON, V.H. 2014. Antiangiogenic therapy effects on age-associated matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and insulin-like growth factor receptor-1 (IGFR-1) responses: a comparative study of prostate disorders in aged and TRAMP mice. *Histochem Cell Biol.* DOI: 10.1007/s00418-014-1193-2.
- MUKHERJI, D., TEMRAZ, S., WEHBE, D. & SHAMSEDDINE, A. 2013. Angiogenesis and anti-angiogenic therapy in prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 87(2): 122-131.
- NIU, Y.N. & XIA, S.J. 2009. Stroma-epithelium crosstalk in prostate cancer. *Asian J Androl.* 11(1): 28-35.
- OLUMI, A.F., GROSSFELD, G.D., HAYWARD, S.W., CARROLL, P.R., TLSTY, T.D. & CUNHA, G.R. 1999. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* 59(19): 5002-5011.
- PARUCHURI, S., YANG, J.H., AIKAWA, E., MELERO-MARTIN, J.M., KHAN, Z.A., LOUKOGEORGAKIS, S., SCHOEN, F.J. & BISCHOFF, J. 2006. Human pulmonary valve progenitor cells exhibit endothelial/mesenchymal plasticity in response to vascular endothelial growth factor-A and transforming growth factor-beta2. *Circ Res* 99(8): 861-869.
- POTENTA, S., ZEISBERG, E. & KALLURI, R. 2008. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer* 99(9): 1375-1379.
- REED, M.J., KARRES, N., EYMAN, D., CRUZ, A., BREKKEN, R.A. & PLYMATE, S. 2007. The effects of aging on tumor growth and angiogenesis are tumor-cell dependent. *Int J Cancer* 120(4): 753-760.
- REYNOLDS, A.R. & KYPRIANOU, N. 2006. Growth factor signalling in prostatic growth: significance in tumour development and therapeutic targeting. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 2: S144-152.
- ROWLEY, D.R. 1999. What might a stromal response mean to prostate cancer progression? *Cancer Metastasis Rev.* 17(4): 411-419.

- SÁEZ, C., GONZÁLEZ-BAENA, A.C., JAPÓN, M.A., GIRÁLDEZ, J., SEGURA, D.I., MIRANDA, G., RODRÍGUEZ-VALLEJO, J.M., GONZÁLEZ-ESTEBAN, J. & TORRUBIA, F. 1998. Repressive changes in finasteride-treated human hyperplastic prostates correlate with an upregulation of TGF-beta receptor expression. *Prostate* 37(2): 84-90.
- SAN MARTIN, R., BARRON, D.A., TUXHORN, J.A., RESSLER, S.J., HAYWARD, S.W., SHEN, X., LAUCIRICA, R., WHEELER, T.M., GUTIERREZ, C., AYALA, G.E., ITTMANN, M. & ROWLEY, D.R. 2014. Recruitment of CD34+ fibroblasts in tumor-associated reactive stroma: the reactive microvasculature hypothesis. *Am J Pathol*. DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.02.021.
- SLATER, M., BARDEN, J.A. & MURPHY, C.R. 2000. Changes in growth factor expression in the ageing prostate may disrupt epithelial-stromal homeostasis. *Histochem J*. 32(6): 357-364.
- SOULITZIS, N., KARYOTIS, I., DELAKAS, D., SPANDIDOS, D.A. 2006. Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGF- $\beta$ 1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Int J Oncol* 29(2): 305-314.
- SPRENGER, C.C., PLYMATE, S.R. & REED, M.J. 2008. Extracellular influences on tumour angiogenesis in the aged host. *Br J Cancer* 98(2): 250-255.
- STRIETH, S., EICHHORN, M.E., SUTTER, A., JONCZYK, A., BERGHAUS, A. & DELLIAN, M. 2006. Antiangiogenic combination tumor therapy blocking alpha(v)-integrins and VEGF-receptor-2 increases therapeutic effects in vivo. *Int J Cancer* 119(2): 423-431.
- TUTRONE, R.F.Jr., BALL, R.A., ORNITZ, D.M., LEDER, P., RICHIE, J.P. 1993. Benign prostatic hyperplasia in a transgenic mouse: a new hormonally sensitive investigatory model. *J Urol*. 149(3): 633-699.
- TUXHORN, J.A., AYALA, G.E. & ROWLEY, D.R. 2001. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol*. 166(6): 2472-2483.
- TUXHORN, J.A., AYALA, G.E., SMITH, M.J., SMITH, V.C., DANG, T.D. & ROWLEY, D.R. 2002a. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res*. 8(9): 2912-2923.
- TUXHORN, J.A., McALHANY, S.J., YANG, F., DANG, T.D. & ROWLEY, D.R. 2002b. Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Res*. 62(21): 6021-6025.
- VERONA, E.V., ELKAHLOUN, A.G., YANG, J., BANDYOPADHYAY, A., YEH, I.T. & SUN, L.Z. 2007. Transforming growth factor-beta signaling in prostate stromal cells supports prostate carcinoma growth by up-regulating stromal genes related to tissue remodeling. *Cancer Res*. 67(12): 5737-5746.
- WIKSTRÖM, P., STATTIN, P., FRANCK-LISSBRANT, I., DAMBER, J.E. & BERGH, A. 1998. Transforming growth factor-beta-1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer. *Prostate* 37(1): 19-29.
- ZAR, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th ed. Prentice Hall Upper, New Jersey.
- ZEISBERG, E.M., POTENTA, S., XIE, L., ZEISBERG, M. & KALLURI, R. 2007a. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 67(21): 10123-10128.
- ZEISBERG, E.M., TARNAVSKI, O., ZEISBERG, M., DORFMAN, A.L., MCMULLEN, J.R., GUSTAFSSON, E., CHANDRAKER, A., YUAN, X., PU, W.T., ROBERTS, A.B., NEILSON, E.G., SAYEGH, M.H., IZUMO, S. & KALLURI, R. 2007b. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13(8): 952-961.
- ZHANG, J. & LIU, J. 2013. Tumor stroma as targets for cancer therapy. *Pharmacol Ther* 137(2): 200-215.
- ZHAO, H., PATRA, A., YEH, C.C., TANAKA, Y., OH, B.R. & DAHIYA, R. 2002. Effects of aging on growth factors gene and protein expression in the dorsal and ventral lobes of rat prostate. *Biochem Biophys Res Commun*. 292(2): 482-491.
- ZHAO, X., JOHNSON, J.N., SINGH, K. & SINGH, M. 2007. Impairment of myocardial angiogenic response in the absence of osteopontin. *Microcirculation* 14(3): 233-240.

## 7. DISCUSSÃO SUCINTA E PRINCIPAIS CONCLUSÕES

**A)** A senescência levou ao desenvolvimento de um microambiente de estroma reativo na próstata, caracterizado por aumento da expressão de marcadores de reação estromal e EndMT (VIM,  $\alpha$ SMA, CD34/VIM e CD34/ $\alpha$ SMA) bem como de fatores estimuladores de proliferação celular (IGFR-1), remodelação tecidual (MMP-9) e angiogênese (VEGF, HIF-1 $\alpha$ , FGF-2, CD31 e TGF- $\beta$ ), resultando em desequilíbrio das sinalizações parácrinas do órgão. O envolvimento destas moléculas em processos tumorigênicos certamente propiciou condições para o desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas na próstata durante esse período da vida, caracterizando semelhança com o microambiente de lesões neoplásicas na próstata do modelo TRAMP. Entretanto, a menor distribuição de tais lesões nos animais senis sugeriu que o aumento de uma molécula antiangiogênica (endostatina) possa ter desempenhado papel protetor sobre a próstata.

**B)** Os inibidores SU5416 e TNP-470 apresentaram potencial antitumoral e foram eficazes como agentes antiangiogênicos na senescência, tendo demonstrado sua ação através de diferentes caminhos. Enquanto o tratamento com o inibidor indireto SU5416 influenciou principalmente aspectos estruturais e da remodelação tecidual prostática, levando à diminuição da expressão de MMP-9 e à regressão e/ou interrupção de processos celulares envolvidos na indução e manutenção do fenótipo de estroma reativo, como a possível ocorrência de EndMT; o inibidor direto TNP-470 atuou sobretudo na redução da angiogênese no órgão, criando um microambiente desfavorável à neovascularização em razão de seu potente efeito inibitório sobre o VEGF, principal molécula mediadora das funções endoteliais. Em adição, a combinação desses agentes levou à inversão do balanço angiogênico da próstata, resultando em prevalência da endostatina sobre os fatores estimuladores da angiogênese, fato de grande relevância para limitar o avanço de lesões proliferativas na senescência. Assim, concluiu-se que a associação entre os inibidores direto e indireto foi mais eficiente em minimizar o desequilíbrio glandular e o risco associado de lesões malignas prostáticas durante esse período da vida, provavelmente em razão da ativação de diferentes vias por cada uma das drogas, resultando em um espectro de ação mais amplo para o tratamento.

**C)** A finasterida, administrada isoladamente ou em associação com os inibidores angiogênicos, também foi eficiente em promover a interrupção do estímulo à proliferação

celular, remodelação tecidual e angiogênese no microambiente prostático durante a senescência. Entretanto, os efeitos benéficos deste tratamento devem ser analisados com cautela, considerando a influência positiva da ablação androgênica sobre a expressão de fatores pró-angiogênicos observada neste estudo. Nesse sentido, a baixa amplitude de inibição do FGF-2, especialmente mediante a combinação dos três tratamentos, é alarmante, considerando o possível envolvimento dessa molécula em vias de indução de resistência aos agentes testados. Em adição, o potencial da finasterida em promover, através de vias alternativas à EndMT, a indução do estroma reativo facilitador do desenvolvimento de desordens glandulares deve ser considerado antes de se preconizar a utilização dessa droga no tratamento de alterações prostáticas associadas ao envelhecimento.

**D)** Os presentes resultados evidenciaram a complexidade das alterações prostáticas na senescência assim como o papel crucial da angiogênese e da microvasculatura do órgão no desenvolvimento de um microambiente estromal reativo favorável à progressão tumoral. No entanto, novos estudos fazem-se necessários para elucidar os diversos eventos celulares que levam à formação do estroma reativo associado à condição senil e ao câncer, bem como a ação de agentes inibidores da angiogênese sobre esses processos e sua consequente interferência sobre o desenvolvimento de lesões malignas prostáticas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ABDOLLAHI, A., LIPSON, K.E., SCKELL, A., ZIEHER, H., KLENKE, F., POERSCHKE, D., ROTH, A., HAN, X., KRIX, M., BISCHOF, M., HAHNFELDT, P., GRONE, H.J., DEBUS, J., HLATKY, L. & HUBER, P.E. 2003. Combined therapy with direct and indirect angiogenesis inhibition results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects. *Cancer Res.* 63(24): 8890-8898.
- AYALA, G., TUXHORN, J.A., WHEELER, T.M., FROLOV, A., SCARDINO, P.T., OHORI, M., WHEELER, M., SPITLER, J. & ROWLEY, D.R. 2003. Reactive stroma as a predictor of biochemical-free recurrence in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 9(13): 4792-4801.
- BANERJEE, P.P., BANERJEE, S., LAI, J.M., STRANDBERG, J.D., ZIRKIN, B.R. & BROWN, T.R. 1998. Age-dependent and lobe-specific spontaneous hyperplasia in the Brown Norway rat prostate. *Biol Reprod.* 59(5): 1163-1170.
- BANERJEE, S., BANERJEE, P.P. & BROWN, T.R. 2000. Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. *Endocrinology* 141(2): 821-832.
- BANERJEE, P.P., BANERJEE, S. & BROWN, T.R. 2001. Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the Brown Norway rat prostate. *Endocrinology* 142(9): 4066-4075.
- BARRON, D.A. & ROWLEY, D.R. 2012. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer* 19(6): R187-R204.
- BAVIK, C., COLEMAN, I., DEAN, J.P., KNUDSEN, B., PLYMATE, S. & NELSON, P.S. 2006. The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res.* 66(2): 794-802.
- BERGER, A.P., KOFLER, K., BEKTIC, J., ROGATSCH, H., STEINER, H., BARTSCH, G. & KLOCKER, H. 2003. Increased growth factor production in a human prostatic stromal cell culture model caused by hypoxia. *Prostate* 57(1): 57-65.
- BIANCHI-FRIAS, D., VAKAR-LOPEZ, F., COLEMAN, I.M., PLYMATE, S.R., REED, M.J. & NELSON, P.S. 2010. The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. *PLoS One* 5(9): Epub ahead of print.
- BOEHM, T., FOLKMAN, J., BROWDER, T. & O'REILLY M.S. 1997. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390(6658): 404-407.
- BRENNAN, P.A., JING, J., ETHUNANDAN, M. & GÓRECKI, D. 2004. Dystroglycan complex in cancer. *Eur J Surg Oncol.* 30(6): 589-592.
- CAMPISI, J. 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120(4): 513-522.
- CASTRONOVO, V. & BELOTTI, D. 1996. TNP-470 (AGM-1470): mechanisms of action and early clinical development. *Eur J Cancer* 32A(14): 2520-2527.
- CHIAVEROTTI, T., COUTO, S.S., DONJACOUR, A., MAO, J.H., NAGASE, H., CARDIFF, R.D., CUNHA, G.R. & BALMAIN, A. 2008. Dissociation of epithelial and neuroendocrine carcinoma lineages in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model of prostate cancer. *Am J Pathol.* 172(1): 236-246.
- CHORILLI, M., MICHELIN, D.C. & SALGADO, H.R.N. 2007. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 28(1): 11-23.
- CHUNG, L.W., BASEMAN, A., ASSIKIS, V. & ZHAU, H.E. 2005. Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. *J Urol.* 173(1): 10-20.
- CIRRI, P. & CHIARUGI, P. 2011. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res* 1(4): 482-497.
- CONDON, M.S. 2005. The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. *Semin Cancer Biol.* 15(2): 132-137.

- COPPÉ, J.P., KAUSER, K., CAMPISI, J. & BEAUSÉJOUR, C.M. 2006. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem.* 281(40): 29568-29574.
- COPPÉ, J.P., DESPREZ, P.Y., KRTOLICA, A. & CAMPISI, J. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 5: 99-118.
- CUNHA, G.R., HAYWARD, S.W. & WANG, Y.Z. 2002. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 70(9-10): 473-485.
- DAVALOS, A.R., COPPÉ, J.P., CAMPISI, J. & DESPREZ, P.Y. 2010. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 29(2): 273-283.
- DEAN, J.P. & NELSON, P.S. 2008. Profiling influences of senescent and aged fibroblasts on prostate carcinogenesis. *Br J Cancer* 98(2): 245-249.
- DESMOULIÈRE, A., GEINOZ, A., GABBIANI, F. & GABBIANI, G. 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 122(1): 103-111.
- DJAVAN, B., WALDERT, M., SEITZ, C. & MARBERGER, M. 2001. Insulin-like growth factors and prostate cancer. *World J Urol.* 19(4): 225-233.
- DOLL, J.A., REIHER, F.K., CRAWFORD, S.E., PINS, M.R., CAMPBELL, S.C. & BOUCK, N.P. 2001. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate. *Prostate* 49(4): 293-305.
- DROLLER, M.J. 1997. Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br J Urol.* 79 Suppl 2: 42-52.
- ELENBAAS, B. & WEINBERG, R.A. 2001. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res* 264(1): 169-184.
- ELLEM, S.J. & RISBRIDGER, G.P. 2010. Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 118(4-5): 246-251.
- ELLIS, L.M., TAKAHASHI, Y., LIU, W. & SHAHEEN, R.M. 2000. Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. *Oncologist* 5: 11-15.
- FIGG, W.D., KRUGER, E.A., PRICE, D.K., KIM, S. & DAHUT, W.D. 2002. Inhibition of angiogenesis: treatment options for patients with metastatic prostate cancer. *Invest New Drugs* 20(2): 183-194.
- FOLEY, S.J. & BAILEY, D.M. 2000. Microvessel density in prostatic hyperplasia. *BJU Int.* 85(1): 70-73.
- FOLKMAN, J. 2006. Antiangiogenesis in cancer therapy – endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res.* 312(5): 594-607.
- FOLKMAN, J.H.P. & HLATKY, L. 1998. The logic of anti-angiogenic gene therapy. In: Friedmann T. (Ed). *The Development of Gene Therapy.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1-17.
- FONG, T.A., SHAWVER, L.K., SUN, L., TANG, C., APP, H., POWELL, T.J., KIM, Y.H., SCHRECK, R., WANG, X., RISAU, W., ULLRICH, A., HIRTH, K.P. & McMAHON, G. 1999. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 59(1): 99-106.
- GENNIGENS, C., MENETRIER-CAUX, C. & DROZ, J.P. 2006. Insulin-like growth factor (IGF) family and prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 58(2): 124-145.
- GERVAZ, P., SCHOLL, B., PADRUM, V. & GILLET, M. 2000. Growth inhibition of liver metastasis by the anti-angiogenic drug TNP-470. *Liver* 20(2): 108-113.
- GINGRICH, J.R., BARRIOS, R.J., FOSTER, B.A. & GREENBERG, N.M. 1999. Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2(2): 70-75.
- GREENBERG, N.M.; DEMAYO, F.; FINEGOLD, M.J., MEDINA, D., TILLEY, W.D., ASPINALL, J.O., CUNHA, G.R., DONJACOUR, A.A., MATUSIK, R.J. & ROSEN, J.M. 1995. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(8): 3439-3443.

- HÄGGSTRÖM, S., LISSBRANT, I.F., BERGH, A. & DAMBER, J.E. 1999. Testosterone induces vascular endothelial growth factor synthesis in the ventral prostate in castrated rats. *J Urol.* 161(5): 1620-1625.
- HANAHAH, D. & FOLKMAN, J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86(3): 353-364.
- HAYWARD, S.W., WANG, Y., CAO, M., HOM, Y.K., ZHANG, B., GROSSFELD, G.D., SUDILOVSKY, D. & CUNHA, G.R. 2001. Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line. *Cancer Res.* 61(22): 8135-8142.
- HUSS, W.J., HANRAHAN, C.F., BARRIOS, R.J., SIMONS, J.W. & GREENBERG, N.M. 2001. Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch. *Cancer Res.* 61(6): 2736-2743.
- HUSS, W.J., BARRIOS, R.J., FOSTER, B.A. & GREENBERG, N.M. 2003a. Differential expression of specific FGF ligand and receptor isoforms during angiogenesis associated with prostate cancer progression. *Prostate* 54(1): 8-16.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). 2014. Disponível em: [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br). Acesso em: 05/03/2014.
- JESIK, C.J., HOLLAND, J.M. & LEE, C. 1982. An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate* 3(1): 81-97.
- JOSEPH, I.B., NELSON, J.B., DENMEADE, S.R. & ISAACS, J.T. 1997. Androgens regulate vascular endothelial growth factor content in normal and malignant prostatic tissue. *Clin Cancer Res.* 3: 2507-2511.
- KALLURI, R. & ZEISBERG, M. 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6(5): 392-401.
- KIMBRO, K.S. & SIMONS, J.W. 2006. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 13(3): 739-749.
- KRIEG, M., NASS, R. & TUNN, S. 1993. Effect of aging on endogenous level of 5 alpha-dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, and estrone in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate. *J Clin Endocrinol Metab.* 77(2): 375-381.
- KRTOLICA, A. & CAMPISI, J. 2002. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol.* 34(11): 1401-1414.
- KWABBI-ADDO, B., OZEN, M. & ITTMANN, M. 2004. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 11(4): 709-724.
- LAU, K.M., TAM, N.N., THOMPSON, C., CHENG, R.Y., LEUNG, Y.K. & HO, S.M. 2003. Age-associated changes in histology and gene-expression profile in the rat ventral prostate. *Lab Invest.* 83(5): 743-757.
- LIN, F., WANG, N. & ZHANG, T.C. 2012. The role of endothelial-mesenchymal transition in development and pathological process. *IUBMB Life* 64(9): 717-723.
- LONDON. C.A., SEKHON, H.S., ARORA, V., STEIN, D.A., IVERSEN, P.L. & DEVI, G.R. 2003. A novel antisense inhibitor of MMP-9 attenuates angiogenesis, human prostate cancer cell invasion and tumorigenicity. *Cancer Res Ther.* 10(11): 823-832.
- LYNCH, C.C. & MATRISIAN, L.M. 2002. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 70(9-10): 561-573.
- MABJEESH, N.J. & AMIR, S. 2007. Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis. *Histol Histopathol* 22(5): 559-572.
- MACPHERSON, G.R., NG, S.S.W., FORBES, S.L., MELILLO, G., KARPOVA, T., McNALLY, J., CONRADS, T.P., VEENSTRA, T.D., MARTINEZ, A., CUTTITTA, F., PRICE, D.K. & FIGG, W.D. 2003. Anti-angiogenic activity of human endostatin is HIF-1-independent in vitro and sensitive to timing of treatment in a human saphenous vein assay. *Mol Cancer Ther* 2(9): 845-854.

- MAJUMDER, P.K., GRIZANSIO, C., O'CONNELL, F., BARRY, M., BRITO, J.M., XU, Q., GUNEY, I., BERGER, R., HERMAN, P., BIKOFF, R., FEDELE, G., BAEK, W.K., WANG, S., ELLWOOD-YEN, K., WU, H., SAWYERS, C.L., SIGNORETTI, S., HAHN, W.C., LODA, M. & SELLERS, W.R. 2008. A prostatic intraepithelial neoplasia-dependent p27 Kip1 checkpoint induces senescence and inhibits cell proliferation and cancer progression. *Cancer Cell* 14(2): 146-155.
- MAÑES, S., LLORENTE, M., LACALLE, R.A., GÓMEZ-MOUTÓN, C., KREMER, L., MIRA, E. & MARTÍNEZ-A, C. 1999. The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J Biol Chem*. 274(11): 6935-6945.
- MARKER, P.C., DONJACOUR, A.A., DAHIYA, R. & CUNHA, G.R. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol*. 253(2): 165-174.
- MARKWALD, RR., FITZHARRIS, T.P. & MANASEK, F.J. 1977. Structural development of endocardial cushions. *Am J Anat* 148(1): 85-119.
- MARKWALD, RR., FITZHARRIS, T.P. & SMITH, W.N. 1975. Structural analysis of endocardial cytodifferentiation. *Dev Biol* 42(1): 160-180.
- MATSUSAKA, S., NAKASHO, K., TERADA, N., SUGIHARA, A., TSUJIMURA, T., TAKANASHI, T., UEMATSU, K., OKAMOTO, E. & TOYOSAKA, A. 2000. Inhibition by an angiogenesis inhibitor, TNP-470, of the growth of a human hepatoblastoma heterotransplanted into nude mice. *J Pediatr Surg*. 35(8): 1198-1204.
- MAZZUCHELLI, R., MONTIRONI, R., SANTINELLI, A., LUCARINI, G., PUGNALONI, A. & BIAGINI, G. 2000. Vascular endothelial growth factor expression and capillary architecture in high-grade PIN and prostate cancer in untreated and androgen-ablated patients. *Prostate* 45(1): 72-79.
- MEDICI, D. & KALLURI, R. 2012. Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype. *Semin Cancer Biol* 22(5-6): 379-384.
- MEDICI, D., POTENTA, S. & KALLURI, R. 2011. Transforming growth factor- $\beta$ 2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling. *Biochem J*. 437(3): 515-520.
- MEDICI, D., SHORE, E.M., LOUNEY, V.Y., KAPLAN, F.S., KALLURI, R. & OLSEN, B.R. 2010. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med* 16(12): 1400-1406.
- MILLER, M.I. & PUCHNER, P.J. 1998. Effects of finasteride on hematuria associated with benign prostate hyperplasia: long-term follow-up. *Urology* 51(2): 237-240.
- MONTICO, F., HETZL, A.C., CÂNDIDO, E.M., FÁVARO, W.J. & CAGNON, V.H.A. 2011. Hormonal therapy in the senescence: Prostatic microenvironment structure and adhesion molecules. *Micron* 42(6): 642-655.
- MORRISSEY, C., BUSER, A., SCOLARO, J., O'SULLIVAN, J., MOQUIN, A. & TENNISWOOD, M. 2002. Changes in hormone sensitivity in the ventral prostate of aging Sprague-Dawley rats. *J Androl*. 23(3): 341-351.
- NIU, Y.N. & XIA, S.J. 2009. Stroma-epithelium crosstalk in prostate cancer. *Asian J Androl*. 11(1): 28-35.
- OLUMI, A.F., GROSSFELD, G.D., HAYWARD, S.W., CARROLL, P.R., TLSTY, T.D. & CUNHA, G.R. 1999. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*. 59(19): 5002-5011.
- O'REILLY, M.S., BOEHM, T., SHING, Y., FUKAI, N., VASIOS, G., LANE, W.S., FLYNN, E., BIRKHEAD, J.R., OLSEN, B.R. & FOLKMAN, J. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88(2): 277-285.
- PAREEK, G., SHEVCHUK, M., ARMENAKAS, N.A., VASJOVIC, L., HOCHBERG, D.A., BASILLOTE, J.B. & FRACCHIA, J.A. 2003. The effect of finasteride on the expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density: a possible mechanism for decreased prostatic bleeding in treated patients. *J Urol*. 169(1): 20-23.
- POLLAK, M.N., SCHERNHAMMER, E.S. & HANKINSON, S.E. 2004. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 4(7): 505-518.



- POTENTA, S., ZEISBERG, E. & KALLURI, R. 2008. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer* 99(9): 1375-1379.
- REED, M.J., KARRES, N., EYMAN, D., CRUZ, A., BREKKEN, R.A. & PLYMATE, S. 2007. The effects of aging on tumor growth and angiogenesis are tumor-cell dependent. *Int J Cancer* 120(4): 753-760.
- RETTETTER, A.S., FIGG, W.D. & DAHUT, W.L. 2003. The combination of antiangiogenic and cytotoxic agents in the treatment of prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* 2(3): 153-159.
- REYNOLDS, A.R. & KYPRIANOU, N. 2006. Growth factor signalling in prostatic growth: significance in tumour development and therapeutic targeting. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 2: S144-152.
- RIZZO, S., ATTARD, G. & HUDSON, D.L. 2005. Prostate epithelial stem cells. *Cell Prolif.* 38(6): 363-374.
- ROBERTS, A.B., SPORN, M.B., ASSOIAN, R.K., SMITH, J.M., ROCHE, N.S., WAKEFIELD, L.M., HEINE, U.I., LIOTTA, L.A., FALANGA, V., KEHRL, J.H. & FAUCI, A.S. 1986. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci.* 83(12): 4167-4171.
- ROWLEY, D.R. 1999. What might a stromal response mean to prostate cancer progression? *Cancer Metastasis Rev.* 17(4): 411-419.
- ROY-BURMAN, P., WU, H., POWELL, W.C., HAGENKORD, J. & COHEN, M.B. 2004. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer* 11(2): 225-254.
- RYU, B.Y., ORWIG, K.E., OATLEY, J.M., AVARBOCK, M.R. & BRINSTER, R.L. 2006. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells* 24(6): 1505-1511.
- SCHMIDT, A., SOMMER, F., REINER, M., KLOTZ, T., ENGELMANN, U., ADDICKS, K. & BLOCH, W. 2005. Differential endostatin binding to bladder, prostate and kidney tumour vessels. *BJU Int.* 95(1): 174-179.
- SIM, B.K., MACDONALD, N.J. & GUBISH, E.R. 2000. Angiostatin and endostatin: endogenous inhibitors of tumor growth. *Cancer Metastasis Rev.* 19(1-2): 181-190.
- SOULITZIS, N., KARYOTIS, I., DELAKAS, D., SPANDIDOS, D.A. 2006. Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGF- $\beta$ 1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Int J Oncol* 29(2): 305-314.
- SPRENGER, C.C., PLYMATE, S.R. & REED, M.J. 2008. Extracellular influences on tumour angiogenesis in the aged host. *Br J Cancer* 98(2): 250-255.
- STROHMEYER, D., RÖSSING, C., STRAUSS, F., BAUERFEIND, A., KAUFMANN, O. & LOENING, S. 2000. Tumor angiogenesis is associated with progression after radical prostatectomy in pT2/pT3 prostate cancer. *Prostate* 42(1): 26-33.
- SUGIMURA, Y., CUNHA, G.R. & DONJACOUR, A.A. 1986. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod.* 34(5): 961-971.
- TAKAMOTO, T., SASAKI, M., KUNO, T. & TAMAKI, N. 2001. Flk-1 specific kinase inhibitor (SU5416) inhibited the growth of GS-9L glioma in rat brain and prolonged the survival. *Kobe J Med Sci.* 47(4): 181-191.
- THOMAS, L.N., DOUGLAS, R.C., LAZIER, C.B., GUPTA, R., NORMAN, R.W., MURPHY, P.R., RITTMASER, R.S. & TOO, C.K. 2008a. Levels of 5 $\alpha$ -reductase type 1 and type 2 are increased in localized high grade compared to low grade prostate cancer. *J Urol.* 179(1): 147-151.
- THOMAS, L.N., DOUGLAS, R.C., LAZIER, C.B., TOO, C.K., RITTMASER, R.S. & TINDALL, D.J. 2008b. Type 1 and type 2 5 $\alpha$ -reductase expression in the development and progression of prostate cancer. *Eur Urol.* 53(2): 244-252.
- TINDALL, D.J. & RITTMASER, R.S. 2008. The rationale for inhibiting 5 $\alpha$ -reductase isoenzymes in the prevention and treatment of prostate cancer. *J Urol.* 179(4): 1235-1242.
- TOMAS, D., SPAJIC, B., MILOSEVIC, M., DEMIROVIC, A., MARUSIC, Z. & KRUSLIN, B. 2010. Intensity of stromal changes predicts biochemical recurrence-free survival in prostatic carcinoma. *Scand J Urol Nephrol.* 44(5): 284-290.

- TUXHORN, J.A., AYALA, G.E. & ROWLEY, D.R. 2001. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol.* 166(6): 2472-2483.
- TUXHORN, J.A., AYALA, G.E., SMITH, M.J., SMITH, V.C., DANG, T.D. & ROWLEY, D.R. 2002a. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res.* 8(9): 2912-2923.
- TUXHORN, J.A., McALHANY, S.J., DANG, T.D., AYALA, G.E. & ROWLEY, D.R. 2002b. Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer Res.* 62(11): 3298-3307.
- TUXHORN, J.A., McALHANY, S.J., YANG, F., DANG, T.D. & ROWLEY, D.R. 2002c. Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Res.* 62(21): 6021-6025.
- VAN MOORSELAAR, R.J. & VOEST, E.E. 2002. Angiogenesis in prostate cancer: its role in disease progression and possible therapeutic approaches. *Mol Cell Endocrinol.* 197(1-2): 239-250.
- VERONA, E.V., ELKAHLOUN, A.G., YANG, J., BANDYOPADHYAY, A., YEH, I.T. & SUN, L.Z. 2007. Transforming growth factor-beta signaling in prostate stromal cells supports prostate carcinoma growth by up-regulating stromal genes related to tissue remodeling. *Cancer Res.* 67(12): 5737-5746.
- WIKSTRÖM, P., STATTIN, P., FRANCK-LISSBRANT, I., DAMBER, J.E. & BERGH, A. 1998. Transforming growth factor-beta-1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer. *Prostate* 37(1): 19-29.
- YOSHIJI, H., HARRIS, S.R. & THORGEIRSSON, U.P. 1997. Vascular endothelial growth factor is essential for initial but not continued *in vivo* growth of human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 57(18): 3924-3928.
- ZEISBERG, E.M., POTENTA, S., XIE, L., ZEISBERG, M. & KALLURI, R. 2007a. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 67(21): 10123-10128.
- ZEISBERG, E.M., TARNAVSKI, O., ZEISBERG, M., DORFMAN, A.L., MCMULLEN, J.R., GUSTAFSSON, E., CHANDRAKER, A., YUAN, X., PU, W.T., ROBERTS, A.B., NEILSON, E.G., SAYEGH, M.H., IZUMO, S. & KALLURI, R. 2007b. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13(8): 952-961.
- ZHANG, J. & LIU, J. 2013. Tumor stroma as targets for cancer therapy. *Pharmacol Ther* 137(2): 200-215.
- ZHAO, H., PATRA, A., YEH, C.C., TANAKA, Y., OH, B.R. & DAHIYA, R. 2002. Effects of aging on growth factors gene and protein expression in the dorsal and ventral lobes of rat prostate. *Biochem Biophys Res Commun.* 292(2): 482-491.

## 9. ANEXO: CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CEUA/Unicamp

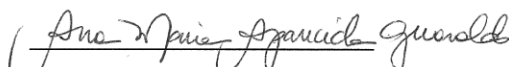
### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Estroma reativo e próstata: senescência e inibição da angiogênese x lesões glandulares no modelo TRAMP" (protocolo nº 2386-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete / Fabio Montico, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 07 de abril de 2011.

Campinas, 07 de abril de 2011.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva