

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

## INSTITUTO DE BIOLOGIA

LARISSA AKEMI KIDO DE BARROS

"INFLAMAÇÃO E LESÕES NEOPLÁSICAS NA PRÓSTATA: TRATAMENTOS QUIMIOPREVENTIVOS COM GONIOTALAMINA E CELECOXIBE EM CAMUNDONGOS SENIS E TRANSGÊNICOS PARA O ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA (TRAMP)."

"INFLAMMATION AND NEOPLASTIC LESIONS IN THE PROSTATE: CHEMOPREVENTIVE TREATMENTS WITH GONIOTHALAMIN AND CELECOXIB IN SENILE MICE AND TRANSGENIC ADENOCARCINOMA OF THE MOUSE PROSTATE (TRAMP)."

> CAMPINAS 2017

## LARISSA AKEMI KIDO DE BARROS

## INFLAMAÇÃO E LESÕES NEOPLÁSICAS NA PRÓSTATA: TRATAMENTOS QUIMIOPREVENTIVOS COM GONIOTALAMINA E CELECOXIBE EM CAMUNDONGOS SENIS E TRANSGÊNICOS PARA O ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA (TRAMP).

## INFLAMMATION AND NEOPLASTIC LESIONS IN THE PROSTATE: CHEMOPREVENTIVE TREATMENTS WITH GONIOTHALAMIN AND CELECOXIB IN SENILE MICE AND TRANSGENIC ADENOCARCINOMA OF THE MOUSE PROSTATE (TRAMP).

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

Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctorate in Cellular and Structural Biology, in the area of Anatomy.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA LARISSA AKEMI KIDO DE BARROS E ORIENTADA PELA Dra. VALÉRIA HELENA ALVES CAGNON QUITETE

Orientadora: VALÉRIA HELENA ALVES CAGNON QUITETE

CAMPINAS 2017

#### Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/01294-8; CAPES

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

٢	<54i	<ul> <li>Kido, Larissa Akemi, 1988- Inflamação e lesões neoplásicas na próstata : tratamentos quimiopreventivos com Goniotalamina e Celecoxibe em camundongos senis e transgênicos para o adenocarcinoma de próstata (TRAMP) / Larissa Akemi Kido de Barros. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.</li> </ul>
		Orientador: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
		1. Próstata. 2. Inflamação. 3. Câncer. 4. Goniotalamina. 5. Celecoxibe. I. Cagnon, Valéria Helena Alves, 1967 II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Inflammation and neoplastic lesions in the prostate : chemopreventive treatments with Goniothalamin and Celecoxib in senile mice and transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) Palavras-chave em inglês: Prostate Inflammation Cancer Goniothalamin Celecoxib Área de concentração: Anatomia Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural Banca examinadora: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete [Orientador] Rejane Maira Góes Ana Carolina de Mattos Zeri Adriana Fogagnolo Mauricio Bruno Cesar Schimming Data de defesa: 19-04-2017 Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 19 de abril de 2017

### COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Profa. Dra. Rejane Maira Góes

Profa. Dra. Ana Carolina de Mattos Zeri

- Profa. Dra. Adriana Fogagnolo Maurício
- Prof. Dr. Bruno Cesar Schimming

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

#### Dedicatória

Aos meus pais,

Meus maiores incentivadores, minha torcida incansável, minhas referências de vida, meus amores de uma vida inteira. A vocês dedico este trabalho como forma de honrar tudo o que vocês me proporcionaram até aqui. Obrigada por sonharem os meus sonhos e vivê-los comigo. Vocês sempre terão o meu amor, gratidão e respeito.

#### Agradecimentos

A Deus, minha fonte de sabedoria e conhecimento.

Aos meus pais **Lola e Nobuo**, pelo amor infindável, por nortearem minha vida através dos valores que me ensinaram. E acima de tudo, por colocarem nossa família sempre em primeiro lugar.

Ao meu esposo, companheiro e amigo. **Paulo**, essa tese é um pouco sua também! Obrigada por todo amor e compreensão durante este período. O seu amor, cuidado e incentivo foram fundamentais para que esta etapa se cumprisse. Essa conquista é nossa.

Ao meu irmão **Felipe**, pela generosidade e carinho de sempre. Você me inspira e me ensina a querer ser melhor sempre.

À minha avó Iracilda pelo cuidado, amor e cumplicidade de uma vida inteira.

À minha orientadora e amiga **Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete**, pela presença em cada detalhe dessa tese e, também, da minha vida. O convívio com você trouxe grandes aprendizados que levarei para sempre comigo. Obrigada por me fazer ir além do que eu achava que poderia.

Aos meus colegas do Laboratório Biologia da Reprodução, Celina de Almeida Lamas, Ellen Pangrazi, Pedro Augusto Marischka Mateus e Raquel Frenedoso da Silva por contribuírem para finalização desta tese, pela confiança e respeito construídos nesses últimos anos.

Aos antigos colegas do Laboratório de Biologia da Reprodução, Amanda Cia Hetzl Agostineto, Eduardo Marcelo Cândido, Fabio Montico, Raisa Mistieri Lorencini e Rafael Sauce, obrigada pelos anos de convívio, contribuição, aprendizado e amizade.

Ao **Fabio Montico**, amigo, parceiro de bancada e de viagens, por trazer sensatez quando os desafios acadêmicos eram grandes, por me ensinar cada técnica que desenvolvi nesse trabalho e pela lealdade de sempre.

À **Dr. Ronaldo Aloise Pilli e Dra. Débora Vendramini Costa** pelas valiosas contribuições acadêmicas e pela produção da Goniotalamina.

Aos colegas do **Laboratório de Plasticidade Muscular** e à professora **Dra. Elaine Minatel** pela troca conhecimento nos trabalhos desenvolvidos em conjunto e, também, pela amizade.

Ao Laboratório de RMN do Laboratório de Biociências pelo espaço e equipamentos cedidos para a realização desse trabalho

À Ana Carolina de Mattos Zeri por todo auxílio e paciência na padronização dos métodos de extração da próstata para RMN.

Ao Maurício Sforça pelo auxilio das leituras de RMN.

À Adriana Fogagnolo Maurício pelo auxílio com interpretação dos dados RMN.

Ao **Dr. Humberto Santo Neto, Dra. Carla Collares Buzato e Dra. Caroline Caramano**, pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

Aos funcionários do **Departamento de Biologia Estrutural e Funciona**l pela contribuição direta e indireta para a execução deste trabalho.

À Liliam Alves Senne Panagio, pela competência, prontidão e efiência com que desenvolve seu trabalho.

À **Universidade Estadual de Campinas** por me proporcionar com excelência o acesso ao saber durante os anos de pós-graduação.

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

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES**) pelo auxílio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (Processo 2013/-01294-8).

#### RESUMO

A inflamação desempenha importante papel no surgimento e na progressão de lesões prostáticas, estando frequentemente relacionada ao processo de envelhecimento. Nesse sentido, terapias quimiopreventivas tem se destacado como uma nova abordagem terapêutica, as quais tem por finalidade atenuar e/ou bloquear os agentes primários da iniciação do câncer, tal como a inflamação. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial quimiopreventivo do anti-inflamatório não esteroidal Celecoxibe, e da Goniotalamina (GTN), estiril-lactona presente em plantas do gênero Goniothalamus, através da análise de parâmetros relacionados à morfológia, inflamação, proliferação, apoptose e sobrevivência celular da próstata ventral de camundongos senis (FVB) e transgênicos para adenocarcinoma de próstata (TRAMP). Neste estudo, camundongos FVB senis (52 semanas de idade) e TRAMP (8 semanas de idade) foram tratados durante 4 semanas com Celecoxibe (10mg/Kg/dia) e GTN (150mg/Kg/dia), sendo ambos tratamentos administrados isoladamente em cada grupo experimental. Os camundongos TRAMP tratados com Celecoxibe e GTN foram subdivididos em dois grupos experimentais: 1) grupo de resposta imediata, isto é, eutanaziados logo após o término do tratamento; 2) grupo de resposta tardia, os quais foram eutanaziados após 10 semanas do término do tratamento. Para análise de ressonância magnética nuclear (RMN) foram utilizados três grupos experimentais: SENIL FVB; e TRAMP de 8 (T8) e 12 (T12) semanas de idade. Os resultados apresentados demonstraram que o envelhecimento propiciou o surgimento de alterações morfológicas na próstata como atrofia e proliferação epitelial, hipertrofia e hiperplasia estromal, bem como aumento de mediadores pró-inflamatórios (COX-2, NfkB, TNF-α, IL-6 e IL-1β). Semelhantemente, níveis aumentados dos mesmos marcadores inflamatórios, e fatores relacionados à eventos de proliferação celular como STAT-3 e IGFR-1 foram verificados na próstata dos camundongos TRAMP conforme o aumento da agressividade das lesões. Os tratamentos com GTN e Celecoxibe foram efetivos na diminuição dos mediadores pró-inflamatórios e recuperação da morfologia glandular em ambos os modelos animais. Destacamos a eficácia da GTN no modelo TRAMP nos períodos de resposta imediata e tardia ao tratamento, onde foi verificado a diminuição significativa da incidência de lesões pré-malignas e malignas. Esses resultados foram confirmados pela diminuição significativa da imunomarcação do marcador de proliferação celular PCNA. No modelo senil a GTN e o Celecoxibe também mostrou-se efetiva na contenção de lesões proliferativas e aumento da apoptose celular. No TRAMP, o Celecoxibe mostrou-se efetivo na regulação dos níveis de COX-2, mesmo em estágios avançados da doenca. Contudo, o tratamento com GTN influenciou maior quantidade de vias envolvidas no desenvolvimento do adenocarcinoma prostático, quando comparado ao Celecoxibe. Quanto à análise metabolômica, os resultados demonstraram aumento significativos no metabolismo de glicerofosfolipídeos durante a senescência, e diminuição do citrato no modelo de câncer. Assim sendo, concluímos que a senescência é capaz de criar um microambiente potencialmente capaz de desenvolver lesões neoplásicas, considerando o processo inflamatório e aumento proteico e metabólico de indicadores de processos proliferativos. Além disso, concluímos que o controle do processo inflamatório em estágios iniciais do desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas tanto no modelo senil, guanto no modelo TRAMP foi fundamental para regulação negativa de vias de sinalização envolvidas em processos proliferativos.

#### ABSTRACT

Inflammation plays an important role in the onset and progression of prostatic lesions, and is often related to the aging process. Therefore, chemopreventive therapy has emerged as a new therapeutic approach, which aims to mitigate and / or block the primary cancer initiation agents, such as inflammation. Thus, the aim of this thesis was to evaluate and compare the effects of Goniothalamin (GTN) and Celecoxib on the structural and molecular parameters in the ventral prostate in senile (FVB) and transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) mice. Senile FVB mice (52 weeks old) and TRAMP mice (8 weeks old) were treated for 4 weeks with Celecoxib (10 mg / kg / day) or GTN (150mg / kg / day). Both treatments were administered separately in each experimental group. The TRAMP mice treated with Celecoxib or GTN were divided into two groups: 1) immediate response group, i.e., euthanized immediately after the treatment; 2) late response group, i. e. euthanized after 10 weeks of treatment. For nuclear magnetic resonance analysis (1H-NMR), three experimental groups were evaluated: SENILE FVB mice; and TRAMP mice at 8 (T8) and 12 (T12) weeks of age. The aging process contributed to morphological changes in the prostate such as atrophy and proliferation in the epithelial compartment, stromal hypertrophy and hyperplasia, and an increase of pro-inflammatory mediators (COX-2, NFKB, TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL- 1 $\beta$ ). Similarly, increased levels of these inflammatory markers, as well as factors related to proliferation (STAT-3 and IGFR-1), were observed in the prostate of TRAMP mice throughout the disease progression. GTN and Celecoxib treatments were effective in controlling the inflammation and led to glandular morphology recovery in both animal models. Our data highlighted GTN efficacy in TRAMP groups, which showed a significant decrease in the incidence of premalignant and malignant lesions. These results were confirmed by a significant decrease in the PCNA cell proliferation marker. Celecoxib was effective in COX-2 pathway regulatation, even at advanced cancer stages. However, GTN treatment influenced greater amount of pathways involved in prostate cancer development, when compared to Celecoxib. In the senile model, both treatments prevented the onset of proliferative lesions and increased cell apoptosis. In relation to the metabolomic analysis, the results showed a significant increase in the glycerophospholipid metabolism during senescence, and a citrate decrease in the cancer model. In conclusion, this study confirmed the senile prostatic microenvironment susceptibility to the development of neoplasias through the protein and metabolic increase of proliferative process markers. Furthermore, the control of the inflammatory process at early stages of the development of precancerous lesions in senile and TRAMP mice was key to downregulate signaling pathways involved in proliferative processes.

#### LISTA DE ABREVIATURAS

AIP: Atrofia inflamatória proliferativa AKT: Proteina quinase B / Protein kinase B AP-1: Proteína ativadora 1 / Activator protein -1 AR: Receptor de andrógeno / Androgen Receptor BCL-2: Célula-B de linfoma 2 / B-cell lymphoma 2 BPH: Benign prostatic hyperplasia BSA: Bovine serum albumin CaP: Câncer de próstata CMC: Carboximetilcelulose / carboxymethyl cellulose COX-2: Ciclooxigenase-2 / Cycloxygenase-2 DAB: 3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloreto / 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride DHEA: Deidroepiandrosterona/ dehydroepiandrosterone ER-a: Receptor de estrógeno alfa / Estrogen receptor alpha FVB: Linhagem de camundongos "Friend Virus B" GTN: Goniotalamina / Goniothalamin HBP: Hiperplasia Benigna da Próstata HGPIN: High grade prostatic intraepithelial neoplasia HL60: Linhagem celular de leucemia prémielocítica / Human promyelocytic leukemia cells IGF: Fator de crescimento homólogo à insulina / Insulin-like growth factor IGFR: Receptor do fator de crescimento homólogo à insulina / Insulin-like growth factor receptor IL: Interleucina / interleucin iNOS: Inducible nitric oxide synthase JAK: Janus kinase LGPIN: Low-grade prostatic intraepithelial neoplasia LNCAP: Linhagem celular de adenocarcinoma prostática sensível a andrógenos NfkB: Fator nuclear kappa B / Nuclear factor-kappa B NIP: Neoplasia intraepitelial prostática NOS: Nitric oxide synthase NSAID: Drogas anti-inflamatórias não esteroidais / Nonsteroidal anti-inflammatory drugs PBS: Tampão fosfato salino / Phosphate-buffered saline PC3: Linhagem celular de adenocarcinoma prostática não sensível a andrógenos PCa: Prostate Cancer

PCNA: Antígeno Nuclear da Proliferação Celular / Proliferating cell nuclear antigen

PIA: Proliferative inflammatory atrophy

pNfkB: Fator nuclear kappa B fosforilado / Nuclear factor-kappa B phosphorylated

- PPAR: Receptores ativados por proliferadores de peroxissomo
- PSA: Antígeno específico da próstata/ Prostate specific antigen
- pSTAT3: Transdutor de sinal e ativador de transcrição fosforilado / Signal transducer and
- activator of transcription phosphorylated
- RIPA: Radioimmunoprecipitation assay buffer
- RMN: Ressonância magnética nuclear
- RNS: reactive nitrogen species
- ROS: Espécies reativas de oxigênio
- SDS: Sodium dodecyl sulfate
- SOCS suppressor of the cytokine signaling
- STAT: Transdutor de sinal e ativador de transcrição / Signal transducer and activator of transcription
- TBS-T: Tris-buffered saline
- TNF-α: Factor de necrose tumoral alfa / Tumor necrosis factor alpha
- TRAMP: Transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate
- VCAM-1: Molécula de adesão celular vascular-1 / Vascular cell adhesion protein 1

## SUMÁRIO

Dedicatória			
Agradecimentos			
Resumo			
Abstract			
Lista de Abreviaturas			
1. INTRODUÇÃO			
1.1. Generalidades da Próstata	13		
1.2. Senescência e Lesões Prostáticas	15		
1.3. Modelo TRAMP	16		
1.4. Inflamação e Lesões Prostáticas	18		
1.5. Inflamação, Drogas Não-esteroidais e Quimioprevenção	22		
1.6. Goniotalamina	23		
1.7. Metabolômica	25		
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS			
3. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS			
3.1. Animais e Procedimento Experimental	28		
3.2. Análise Morfológica	30		
3.3. Análise Morfométrica	31		
3.4. Imunoistoquímica	31		
3.5. Extração de Proteínas e Western Blotting	32		
3.6. Dosagens de IL-6, IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 por método imunoenzimático (ELISA)	34		
3.7. PCNA	34		
3.8. TUNEL	35		
3.9. Ressonância Magnética Nuclear	35		
3.10. Análise Estatística	36		
4. ARTIGO CIENTIFICO I			
5. ARTIGO CIENTÍFICO II	79		
6. ARTIGO CIENTÍFICO III			
7. CONSIDERAÇÕES GERAIS DA TESE			
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS DA TESE			
9. APÊNDICES			
10. ANEXOS			

#### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. Generalidades da Próstata

A próstata é uma glândula sexual acessória masculina presente em todas as ordens de mamíferos e desempenha importante papel no processo reprodutivo (Setchell and Brooks, 1988; Marker et al., 2003; Untergasser et al., 2005). Esta glândula produz uma secreção composta por diferentes constituintes como ácido cítrico, espermina, prostaglandinas, fosfatase ácida, e zinco, os quais propiciam um meio favorável para o condicionamento e sobrevivência dos espermatozoides (Frick and Aulitzky, 1991; Hayward and Cunha, 2000).

Nos roedores, a próstata é constituída por três pares de lobos: ventral, lateral e dorsal, de acordo com a localização ao redor da uretra prostática, e um par de glândulas coaguladoras ou próstata anterior localizadas na face côncava das vesículas seminais (Figura 1) (Jesik et al., 1982; Sugimura et al., 1986; Aumuller and Seitz, 1990; Oliveira et al., 2016). Esses lobos estão conectados à uretra por uma série de ductos e são funcionalmente similares à próstata humana (Jesik et al., 1982; Aaron et al., 2016). Os diferentes lobos prostáticos diferem quanto à morfologia, os tipos de produtos secretados e à resposta hormonal (Costello and Franklin, 1994; Colombel and Buttyan, 1995; Oliveira et al., 2016). De maneira geral, a histologia da próstata é definida por um conjunto de estruturas túbuloalveolares, onde o epitélio secretor simples encontra-se envolvido pelo estroma (Aumuller and Adler, 1979). O epitélio prostático é constituído, predominantemente, por células colunares secretoras, além de células basais entremeadas às células epiteliais, e em menor número células neuroendócrinas (McNeal, 1988; Abate-Shen and Shen, 2000; Garraway et al., 2003; Oliveira et al., 2016). O estroma prostático é formado por um arranjo complexo de células estromais e matriz extracelular associados a fatores de crescimento, moléculas reguladoras e enzimas de remodelação, as quais provêm sinais biológicos gerais e exercem influências mecânicas sobre as células epiteliais (Tuxhorn et al., 2001; Cunha and Matrisian, 2002; Bianchi-Frias et al., 2010). É conhecido que a interação epitélio-estroma tem papel fundamental na manutenção da estrutura e funcionamento da próstata e, baseando-se em

aspectos morfológicos, funcionais e embriológicos, esta interação pode ser considerada como única unidade funcional (Aumuller and Seitz, 1990; Ekman, 2000; Hayward and Cunha, 2000). Nesse sentido, o desequilíbrio da interação epitélio-estroma na próstata favorece o desenvolvimento de processos neoplásicos (Cunha et al., 2002). Além disso, células estromais associadas às células tumorais podem responder aos andrógenos e a fatores de crescimento levando a interrupção da homeostase epitélio-estromal, o que desencadeia processos de crescimento, migração, angiogênese, apoptose e metástases tumorais (Cunha et al., 2001; Cunha et al., 2003).

Apesar da próstata ser primariamente regulada por andrógenos, o seu desenvolvimento em humanos e roedores é sensível a outros hormônios, como o estrógeno, o qual atua sinergicamente à testosterona influenciando tanto as funções normais do órgão, quanto alterações patológicas (Weihua et al., 2001; Cunha et al., 2002). Os efeitos estrogênicos na próstata são complexos e podem envolver tanto ações diretas sobre o tecido prostático, através dos receptores estrogênicos, como indiretas, através da regulação negativa do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, causando a redução dos níveis de andrógenos circulantes (Cunha et al., 2002; Taylor et al., 2006; Bonkhoff and Berges, 2009). **Figura 1.** 



**Figura 1.** Órgãos urogenitais de camundongos machos. Próstata: Lobo Ventral (VP); Lobo Lateral (LP); Lobo Dorsal (DP); Lobo Anterior ou Glândula de Coagulação (AP). Uretra (U); Vesícula Seminal (SV). Bexiga Urinária (B) (Modificado de Oliveira et al., 2016)

#### 1.2. Senescência e Lesões Prostáticas

O envelhecimento está associado a mudanças significantes no ambiente hormonal sendo fator causador de alterações morfofuncionais na próstata, as quais predispõem o órgão ao desenvolvimento de desordens urológicas tais como a hiperplasia benigna da próstata (HBP) e o câncer de próstata (CaP) (Banerjee et al., 2000; Krtolica and Campisi, 2002; Lau et al., 2003; Roy-Burman et al., 2004). É esperado que nos próximos anos o câncer seja o principal responsável de morte por doenças, superando doenças do coração (Siegel et al., 2015). No Brasil, com exceção dos tumores de pele não melanoma, CaP é o mais incidente entre homens, sendo estimado cerca de 61.200 novos casos para 2016 (INCA, 2015). Embora haja variações entre os indivíduos, há um declínio progressivo nos níveis de testosterona e dehidroepiandrosterona circulantes, o qual é acompanhado por um acréscimo na conversão de andrógenos em estrógenos, resultando no desequilíbrio hormonal (Srinivasan et al., 1995; Harman et al., 2001). Além disso, altos níveis de estrógeno associados a baixos níveis de testosterona tem sido relacionados ao aumento do processo inflamatório e à emergência de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas na próstata (Ellem et al., 2009; Jia et al., 2015).

No animal senil, a depleção androgênica é causadora da involução das células epiteliais prostáticas, aumento de células inflamatórias, atipia focal, além da diminuição da taxa de receptores androgênicos (Cavazos, 1975; Lau et al., 2003; Kido et al., 2014). Segundo Lau et al. (2003), tais alterações evidenciadas na próstata de ratos senis são similares àquelas verificadas na hiperplasia benigna prostática em humanos. Esses mesmos autores sugeriram perda de função prostática na senescência como resultado da diminuição da expressão de genes de síntese e checagem de proteínas e inibição do crescimento celular,

declínio do metabolismo energético, além da transcrição aumentada de genes relacionados à sobrevivência celular e evasão apoptótica.

Devido às condições patológicas que acometem a próstata preferencialmente durante a senescência, sua morfologia, fisiologia e, recentemente, os complexos mecanismos moleculares que a envolvem, têm sido examinados com particular atenção. Desordens benignas e malignas da próstata estão entre as doenças mais comuns a afetar os homens, particularmente em países industrializados (Ellem and Risbridger, 2010; Siegel et al., 2015). Dentre as doenças prostáticas está a HBP, a qual se caracteriza por uma predominante proliferação estromal e, embora aumento substancial do epitélio também ocorra, a integridade regional da glândula é mantida (Droller, 1997). O CaP, em contraste, é considerado primariamente uma desordem epitelial e, frequentemente estende-se além dos limites normais do órgão (Droller, 1997). Além da HBP e do CaP, outras lesões da próstata tem sido frequentemente reportadas em diferentes tipos de estudos, como a neoplasia intraepitelial prostática (NIP), considerada uma lesão que precede o carcinoma prostático, e a atrofia inflamatória proliferativa (AIP) (De Marzo et al., 1999; Voltaggio et al., 2016). A AIP, descrita inicialmente por De Marzo et al. (2007), é tipicamente associada à inflamação prostática, e considerada uma possível precursora da NIP de alto grau e do CaP (Nelson et al., 2003; De Nunzio et al., 2011). As lesões da AIP tendem a ocorrer na periferia da próstata e emergem como consequência da proliferação regenerativa das células epiteliais como uma resposta a uma injúria causada por infecção, trauma celular resultante de dano oxidativo, hipóxia e autoimunidade (Nelson et al., 2003).

#### 1.3. Modelo TRAMP

Modelos experimentais têm sido utilizados no estudo dos aspectos biológicos e genéticos do desenvolvimento do CaP, destacando-se os modelos murinos geneticamente modificados (Abate-Shen and Shen, 2000; Roy-Burman et al., 2004; Chiaverotti et al., 2008). O camundongo transgênico para o adenocarcinoma de próstata (TRAMP) expressa oncoproteína viral (Tag) SV40 nas células luminais 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; Huss et al., 2001). O TRAMP desenvolve formas progressivas do câncer durante seu tempo de vida, apresentando NIP entre 6 e 12 semanas de idade, neoplasia bem diferenciada geralmente é observada entre 10 e 16 semanas de idade, e entre 18 e 24 semanas todos os animais exibem tumores primários e metastáticos (Gingrich et al., 1999; Greenberg et al., 1995; Gingrich et al., 1999; Abate-Shen and Shen, 2000; Chiaverotti et al., 2008). A partir de 30 semanas, esses animais apresentam metástases para nódulos linfáticos e/ou pulmões bem como invasão das vesículas seminais (Abate-Shen and Shen, 2000; Chiaverotti et al., 2008; Dal Pozzo et al., 2016). Desta maneira, esse modelo tem sido amplamente utilizado no estudo dos eventos moleculares da progressão do CaP, uma vez que o animal desenvolve tumores prostáticos que compartilham muitas características com o câncer humano, incluindo metástases, progressão para a independência androgênica e diferenciação neuroendócrina (Chiaverotti et al., 2008). Além disso, a utilização de modelos de câncer é vantajosa na pesquisa científica, pois permite que as múltiplas etapas da iniciação e progressão do câncer sejam avaliadas em um sistema controlado (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 [C57BL/6 TRAMP fêmea X FVB] F1 (Greenberg et al., 1995; Gingrich et al., 1999). Para o presente estudo, os camundongos foram gerados nos backgrounds FVB. Essa nítida variação fenotípica na patogênese dos tumores em função da linhagem precursora sugeriu que os fatores genéticos podem ter um efeito profundo na iniciação e progressão do câncer no modelo TRAMP, sendo que muitos estudos subsequentes foram realizados utilizando esses animais (Gingrich et al., 1999; Huss et al., 2003a; Huss et al., 2003b; Isayeva et al., 2007; Chiaverotti et al., 2008).

#### 1.4. Inflamação e Lesões Prostáticas

Em 1863, Virchow já destacava a ideia de que a origem do câncer estava em um sítio de inflamação crônica, baseado na sua hipótese de que algumas classes de irritantes teciduais juntamente com a injúria tecidual, inflamação resultante desses processos provocavam o aumento da proliferação celular (Balkwill and Mantovani, 2001; Crusz and Balkwill, 2015). Assim, por mais de 100 anos, patologistas têm reconhecido que grande parte dos cânceres estão envolvidos com eventos inflamatórios (Rollins, 2006).

A inflamação *per se* é um fenômeno complexo que consiste de componentes humorais e celulares (Sciarra et al., 2008). Além disso, é usualmente um evento auto-limitante, com a liberação inicial de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e angiogênicos, seguidos da resolução da inflamação mediada por citocinas anti-inflamatórias (Hamid et al., 2011). Entretanto, na inflamação crônica composta por células T cronicamente ativadas e fagócitos mononucleares (monócitos e macrófagos), há uma persistência desses promotores ou falha nos mecanismos que finalizam a inflamação. Assim, mais citocinas pró-inflamatórias são liberadas tanto quanto fatores angiogênicos e de crescimento, os quais amplificam a resposta inflamatória (Hamid et al., 2011).

Outro enfoque importante é a inflamação como ponto chave na deflagração de lesões prostáticas, malignas ou não, durante o envelhecimento. A senilidade, como já dito anteriormente, está associada a alterações hormonais e moleculares, como o aumento de infiltrado inflamatório (Ellem and Risbridger, 2010; Jia et al., 2015). É importante salientar que são escassos os estudos considerando as mudanças morfofisiológicas na próstata durante a senilidade como eventos primordiais que antecedem o surgimento de lesões neste órgão. Ao longo dos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem destacado a presença de células inflamatórias associada ao desequilíbrio hormonal, desorganização estrutural, e lesões proliferativas na próstata como decorrência do processo de envelhecimento (Montico et al., 2010; Kido et al., 2014). Bianchi-Frias et al. (2010) apontaram, na próstata de animais senis, o aumento na expressão de genes associados à inflamação, e salientaram a capacidade da resposta e produção de sinais inflamatórios das células estromais durante este período de

vida. Além disso, elevados níveis de específicos marcadores gênicos para *natural killers* foram verificados no tecido prostático de ratos senis (Bianchi-Frias et al., 2010). Estas observações, juntamente com o aumento na expressão gênica imuno-específicas, são consistentes com o aumento da infiltração de linfócitos e macrófagos na próstata de ratos senis, porém, permanece a ser determinado se os infiltrados inflamatórios são a causa ou resposta das alterações moleculares exibidas no estroma senil (Bianchi-Frias et al., 2010). Assim, como os estímulos para a inflamação da próstata estão em grande parte ainda a serem definidos, a compreensão da imunobiologia da próstata ainda é relativamente escassa (Sfanos and De Marzo, 2012).

A expressão e função de citocinas pró-inflamatórias no CaP tem sido extensivamente investigada devido ao seu papel na regulação da proliferação, apoptose, migração, invasão e angiogênese (Culig and Puhr, 2012). Citocinas pró-inflamatórias, tais como as interleucinas IL-1, IL-1α, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8 e IL-17, são secretadas em altas taxas pelas células T e células epiteliais e estromais prostáticas, além dos leucócitos que compõe a maior parte dos infiltrados inflamatórios (De Nunzio et al., 2011; Hamid et al., 2011). Acredita-se que essas citocinas estão envolvidas na regulação do crescimento celular epitelial e estromal, através da interação molecular autócrina e parácrina entre esses grupos celulares ou via indução da expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) (De Nunzio et al., 2011; Hamid et al., 2011; Hamid et al., 2011).

Dentre as várias interleucinas, a IL-6 tem se destacado especialmente em estudos de carcinogênese prostática (Hodge et al., 2005; Culig and Puhr, 2012). A IL-6 é uma citocina multifuncional envolvida em numerosos processos inflamatórios inatos e adaptativos incluindo a ativação das células B, resposta de fase aguda inflamatória e trombopoiese (Hirano, 1992). Além disso, a IL-6 é secretada tanto por células epiteliais normais quanto neoplásicas, e pode atuar como fator de crescimento na HBP e no CaP (Djavan et al., 2009). Outras fontes reconhecidas de IL-6 incluem fibroblastos, monócitos ou macrófagos ativados, células T e B ativadas, células endoteliais, e células estromais (Djavan et al., 2009; Sfanos and De Marzo, 2012). Segundo Mechergui et al. (2009), na ausência de andrógenos, a IL-6 regula o crescimento do carcinoma prostático e ativa o gene dependente do receptor de andrógeno.

Além disso, a IL-6 é principal ativadora da via de sinalização do transdutor de sinal e ativador de transcrição-3 (STAT3) (Hodge et al., 2005; Rojas et al., 2011; Culig and Puhr, 2012). Os transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STATs) incluem uma classe de proteínas citoplasmáticas que atuam na regulação do crescimento e sobrevivência celular (Levy and Lee, 2002; Lavecchia et al., 2011). Em células humanas ou de roedores, a ativação ligante-dependente das proteínas STATs é um processo transiente, que leva diversos minutos ou horas para ser concluído (Lavecchia et al., 2011). Em contraste, em muitos tumores, onde há uma desregulação na produção de fatores de crescimento, as proteínas STAT (especialmente, STAT1, 3 e 5) são constantemente fosforiladas e ativadas (Lavecchia et al., 2011). Assim, níveis anormais de STAT-3 ativadas tem sido observadas em linhas celulares de cânceres de mama, ovário, próstata, entre outros (Bromberg and Wang, 2009; Lavecchia et al., 2011).

Outra molécula relacionada com a inflamação que tem gerado grande interesse no que diz respeito ao câncer da próstata é a ciclooxigenase 2 (COX-2), Esta enzima é uma isoforma induzível das enzimas que convertem o ácido araquidônico em prostaglandinas pró-inflamatórias, podendo sua superexpressão estar relacionada a áreas de atrofia inflamatória proliferativa, um fator de risco previsto para o câncer de próstata (Sfanos and De Marzo, 2012). Na inflamação crônica, a produção de COX-2 é estimulada de maneira contínua, aumentando a produção de prostaglandina E2 e as concentrações de BCL-2 e, ao mesmo tempo, reduzindo a produção de E-caderina, fato que resulta na perda de adesão celular célula-a-célula (Wang et al., 2004; Sobolewski et al., 2010; Hamid et al., 2011). A COX-2 também modula a produção de fatores angiogênicos e encontra-se supra-regulada numa variedade de cânceres, incluindo o CaP (Wang et al., 2004; Caruso et al., 2009). Yoshimura et al. (2000) verificaram que a expressão de COX-2 foi modulada de acordo com o grau de agressividade do adenocarcinoma prostático. Ainda, esses autores encontraram elevada expressão de COX-2 não só no epitélio, mas em vasos sanguíneos e no estroma prostático.

O estresse oxidativo, assim como o genotóxico e o inflamatório também são potentes estimuladores de fatores de transcrição da família NfκB (Tilstra et al., 2011). Devido a

capacidade de responder a diferentes estímulos, o NfkB encontra-se como mediador chave na regulação de diferentes vias relacionadas ao envelhecimento, como resposta imune, metabolismo, senescência celular e apoptose (Tilstra et al., 2011). Entre os fatores de transcrição, as proteínas da familia do fator nuclear kB (NFkB) formadas pelo complexo NFkB/Rel, RelA/p65, c-Rel, RelB e os componentes p50 (p105) e (p100), são essenciais para inflamação, imunidade, proliferação celular e apoptose (Viatour et al., 2005; Salminen et al., 2008; He and Karin, 2011). Em células não estimuladas, o NFkB encontra-se em estado latente no citoplama celular ligadas a proteínas inibidoras lkB (lkB $\alpha$ , lkB $\beta$ , lkBg, lkBe, and Bcl3). Sob estimulação interna ou externa, as proteínas IkB são fosforiladas e, então, ubiquitinadas e processadas pelos proteossomos. Em seguida o complexo NFkB é translocado para o núcleo onde ativará a transcrição de diversos genes, principalmente relacionados a inflamação (Viatour et al., 2005; Salminen et al., 2008; He and Karin, 2011). Existem inúmeras variações de vias capazes de ativar o NFkB, bem como diferentes alvos de ação desse fator de transcrição. A desregulação do NfkB pode potencialmente levar à amplificação da resposta inflamatória, principalmente no microambiente tumoral (Hamid et al., 2011). Wong et al. (2009) verificaram que células epiteliais prostáticas expostas ao meio contendo mediadores pró-inflamatórios solúveis ativaram diretamente o NfkB, o qual induziu a produção local de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, concomitantemente à supraregulação do receptor estrogênico alfa (ER- $\alpha$ ) e a molécula de adesão VCAM-1. Assim, a exposição do microambiente prostático à condição inflamatória destacou a potencial relação entre a inflamação crônica e seu envolvimento na promoção da carcinogênese prostática (Wong et al., 2009).

Polipeptídeos como os fatores de crescimento homólogos à insulina (IGFs) são elementos mitogênicos importantes para o funcionamento das diferentes glândulas sexuais acessórias masculinas, incluindo a próstata (Djavan et al., 2001). O IGF-1 atua como mitógeno em uma variedade de células e suas ações são mediadas por dois tipos de receptores transmembrana; o receptor tipo I (IGFR-I), que é expresso nas células epiteliais e estromais da próstata, e o tipo 2 (IGFR-2), o qual não foi encontrado nas células epiteliais e

estromais da próstata (Djavan et al., 2001). O IGF é produzido por células estromais e atuam como fatores de crescimento parácrinos no epitélio prostático normal, podendo sua acentuada expressão estimular a proliferação de células cancerosas e suas metástases (Weroha and Haluska, 2012; Travis et al., 2016).

#### 1.5. Inflamação, Drogas Não-esteroidais e Quimioprevenção

As células inflamatórias exercem um efeito significativo sobre o desenvolvimento tumoral (Coussens and Werb, 2002). Precocemente no processo neoplásico, as células inflamatórias tornam-se poderosos promotores do tumor, produzindo um ambiente atrativo para o crescimento tumoral, facilitando a instabilidade genômica e promovendo a angiogênese (Coussens and Werb, 2002). As ações pró-tumorais das células inflamatórias incluem a liberação de fatores de crescimento e sobrevivência, promoção da angiogênese, estimulação de danos ao DNA, remodelação da matriz extracelular para facilitar a invasão, revestimento das células tumorais com receptores disponíveis para disseminação através de capilares sanguíneos e linfáticos, e a evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Coussens and Werb, 2002).

A medida que essas evidências crescem com novos trabalhos apontando as associações entre as inflamações crônicas e as lesões prostáticas, tornou-se importante a criação de alternativas para prevenir e ou conter tais lesões, especialmente o CaP, através de agentes controladores da inflamação. Entre eles estão as drogas anti-inflamatórias não esteroidais (NSAID's), as quais tem sido tem sido extensivamente avaliadas, tanto em animais quanto humanos, com enfoque na quimioprevenção e tratamento do câncer (Garcia Rodriguez and Gonzalez-Perez, 2004).

Os NSAID's atuam na inflamação principalmente através da inibição das COXs, e são divididos conforme sua capacidade de inibir a COX-2, sendo descritos como: drogas nãoseletivas, como a Aspirina e o Diclofenaco, que inibem tanto a COX-1 quanto a COX-2; drogas seletivas, como o Celecoxibe e o Rofecoxibe; e as preferenciais para COX-2, como o Meloxicam e a Nimesulida (Sobolewski et al. 2010). A aspirina, embora não seja seletiva para a COX-2, tem sido amplamente estudada em estudos clínicos e como redutora do risco de câncer de cólon, tão bem quanto pulmão, esôfago, estômago, próstata e, até mesmo, alguns tipos de câncer cerebral (Coussens and Werb, 2002; Gravitz, 2011). Entretanto, seu uso ininterrupto e por um longo período tem sido questionado, devido aos efeitos colaterais indesejáveis como ulcerações e hemorragias gastrointestinais (Sobolewski et al., 2010).

Os inibidores da COX-2 desempenham importante papel na prevenção do câncer de maneira geral (Sobolewski et al., 2010). O Celecoxibe e as demais drogas seletivas para COX-2 foram desenvolvidas como uma alternativa para evitar os efeitos indesejáveis do uso crônico da aspirina (De Nunzio et al., 2011; Gravitz, 2011). De fato, o Celecoxibe, exerce controle sobre a inflamação reduzindo a angiogênese e proliferação celular, além de promover a apoptose (Sobolewski et al., 2010; Jendrossek, 2013). Diversos estudos tem apontado ação anti-câncer do Celecoxibe na próstata de humanos e roedores, ressaltando a capacidade desse medicamento na promoção da apoptose, inibição da proliferação celular e, também na prevenção do CaP (Kismet et al., 2004; Patel et al., 2005; Narayanan et al., 2009). Entretanto, o uso prolongado deste medicamento, como outros inibidores de COX-2, tem sido questionado, devido ao risco de fraturas e problemas cardíacos (Gravitz, 2011).

#### 1.6. Goniotalamina

A Goniotalamina (GTN) é uma estiril-lactona isolada a partir da raiz e do caule de plantas do gênero *Goniothalamus* (Figura 2) (Sam et al., 1987). Estudos caracterizaram propriedades citotóxicas, anti-proliferativa, anti-inflamatória e pró-apoptótica deste composto em diferentes linhagens celulares de câncer, incluindo o de próstata (Inayat-Hussain et al., 1999; de Fatima et al., 2006; Al-Qubaisi et al., 2011; Barcelos et al., 2012; Vendramini-Costa et al., 2016). Contudo, são poucos os estudos que abordam os efeitos da GTN em modelos *in vivo*, e até o momento não existem trabalhos relacionados à próstata. Segundo Seyed et al (2014), mais estudos *in vivo* em modelos experimentais de câncer são necessários para se determinar os efeitos farmacológicos e toxicológicos e anti-tumoral da GTN.

Com relação ao mecanismo de ação da GTN nas células tumorais, parte dele devese principalmente à atividade pró-apoptótica desse composto indicada pelo aumento da expressão das caspases 3, 9 e 7, aumento de espécies reativas ao oxigênio (ROS), diminuição da expressão da proteína anti-apopótica BCL-2 e aumento da BAX, proteína próapoptótica (de Fatima et al., 2008; Innajak et al., 2016; Vendramini-Costa et al., 2016). Vendramini-Costa et al. (2010) verificaram que tanto a forma racêmica, quanto as enantioméricas (R)-GTN e (S)-GTN, apresentaram propriedades antiproliferativas no modelo experimental de tumor sólido de Erlich em camundongos Balb/C. Além disso, nenhum sinal de toxicidade foi verificado nos testes realizados. Estes mesmos autores ainda ressaltaram a capacidade antiedematogênica exibida pela GTN racêmica na redução no modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina, sugerindo assim a possível relação das atividades anticâncer e anti-inflamatória deste composto.

Assim sendo, o interesse da ação da GTN sobre o microambiente prostático de animais senis, bem como no modelo TRAMP culminou na parceria junto ao Laboratório de Síntese Orgânica, Departamento de Síntese Orgânica, Instituto de Química (IQ) – UNICAMP, e Divisão de Farmacologia e Toxicologia, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas e Biológicas (CPQBA) - UNICAMP, sendo a Dra. Débora Vendramini Costa responsável pela síntese do composto sintético da GTN racêmica, sob orientação do Prof. Dr. Ronaldo A. Pilli (IQ-UNICAMP) e co-orientação do Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA-UNICAMP). Esta parceria visou ampliar os conhecimentos a respeito da ação da GTN *in vivo* e sua possível utilização na quimioprevenção e ou tratamento de lesões prostáticas

Figura 2.





#### 1.7. Metabolômica

A metabolômica tem se destacado como uma área promissora na descoberta de biomarcadores associados a diferentes tipos de câncer, revelando uma abordagem científica atual através de avanços em diferentes áreas da pesquisa biomédica (Sreekumar et al. 2009, Thysell et al. 2010, Bansal et al. 2013, Gupta et al. 2015). Esta metodologia de análise consiste na avaliação abrangente, identificação e quantificação de diversos metabólitos dos diferentes tipos de tecido do sistema biológico (Fiehn, 2002; Nicholson & Lindon, 2008). Sabese que o câncer é uma doença que modifica o metabolismo celular, sendo, portanto, a análise da metabolômica uma ferramenta vantajosa na detecção e diagnóstico precoce de neoplasias, avaliação de terapias para o câncer e de intervenções clínicas (Roberts et al. 2014).

No caso do câncer de próstata, o diagnóstico de modo geral possui uma série de limitações, tais como a falta de marcadores sensíveis e específicos de tumor, o que pode levar a resultados falsos positivos que acarretam em diagnósticos superestimados, além da utilização de procedimentos invasivos (Thompson et al. 2004; Bangma et al. 2007, Pal et al. 2013). Assim sendo, uma abordagem com precisão, menos invasiva e capaz de identificar o câncer prostático precocemente tornou-se imprescindível na busca de novos tratamentos e controle desta doença (Kumar et al. 2015).

A espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) é uma análise quantitativa utilizada para determinar com alta precisão analítica, as concentrações de uma ampla gama de classes de compostos químicos (Nicholson & Lindon, 2008). Estes metabólitos são identificados por padrões característicos e posições de picos de sinais no espectro de RMN, com o auxílio de bases de dados on-line (Wishart et al., 2009). Todos os estudos metabolômicos produzem conjuntos de dados multivariados e complexos, os quais necessitam de *software* de visualização e métodos estatísticos e de bioinformática robustos para a interpretação e produção de impressões bioquímicas digitais (Nicholson & Lindon, 2008). Nesse sentido, a RMN tem sido utilizada no estudo do câncer e potenciais biomarcadores através da seleção de indicadores desta doença a saber: dimininuição dos níveis de citrato e zinco, aumento de glucose, alanina, creatina, colina, piruvato e lactato.

(Costello & Franklin 2006; Bayley & Devilee, 2012; Kumar et al. 2015). Embora os resultados preliminares sejam promissores, não há atualmente nenhum teste disponível que já esteja sendo utilizado como um procedimento de precisão, diagnóstico ou um teste de triagem (Roberts et al. 2014). Sabe-se que em indivíduos saudáveis, níveis elevados de zinco e citrato são encontrados na zona periférica da próstata e, também, nas secreções prostáticas (Costello et al. 2011). Estes metabólitos são importantes na homeostase do liquido seminal, na regulação de íons cálcio, motilidade e metabolismo dos espermatozoides (Owen & Katz, 2005). O zinco acumula-se no tecido prostático e inibe a enzima m-aconitase, responsável pela oxidação do citrato no ciclo de Krebs, aumentando os níveis de citrato na próstata (Costello & Franklin 2006). Durante processos neoplásicos, a capacidade de acumular zinco é perdida, propiciando a oxidação do citrato e diminuição os níveis deste metabólito (Costello et al. 1999). Segundo Costello et al. (2011), a relação zinco-citrato na próstata é extremamente consistente e relevante no que se refere a distinção de lesões prostáticas malignas e benignas. Ainda, os mesmos autores comprovaram a existência desta mesma relação metabólica no modelo de camundongo TRAMP, fato que reforça ainda mais as similaridades entre este modelo animal e o câncer prostático humano. Níveis elevados de compostos derivados de colina também foram identificados no câncer de próstata, sendo assim classificados e incluídos como biomarcadores desta doença (Swanson et al. 2003).

A literatura especializada indicou e reforçou a relevância da análise da metabolômica, tanto para o diagnóstico como para as intervenções terapêuticas, no câncer de próstata. Desta maneira, este fato nos estimulou à proposta de execução da RMN com dados diferenciais do metabolismo desta doença, fato que vem consolidar os estudos no camundongo TRAMP desenvolvidos pelo Laboratório Biologia da Reprodução.

#### 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A inflamação crônica tem papel importante sobre a regulação do microambiente tecidual prostático, bem como provável envolvimento como agente promotor e ou potencializador das lesões prostáticas, incluindo o adenocarcinoma. Assim sendo, o objetivo geral do presente estudo foi caracterizar diferentes parâmetros da biologia estrutural e molecular do lobo ventral da próstata relacionados ao processo inflamatório à ocorrência de lesões prostáticas nos modelos animais senil e TRAMP tratados com Celecoxibe, antiinflamatório não esteroidal de propriedades já conhecidas, e com Goniotalamina, um novo composto de elevado potencial terapêutico para diferentes tipos de câncer.

Objetivos específicos foram:

- Avaliar e validar os efeitos da Goniotalamina, isômero não natural do grupo de estirillactonas com propriedades anti-inflamatórias, e do Celecoxibe, droga anti-inflamatória não-esteroidal seletiva para COX-2, sobre aspectos morfológicos e moleculares da próstata ventral de camundongos senis FVB e TRAMP;
- b. Quantificar os níveis proteicos e imunolocalizar dos antígenos relacionados ao processo inflamatório e proliferativos na próstata de camundongos senis FVB e TRAMP submetidos aos tratamentos com Goniotalamina e Celecoxibe;
- c. Analisar por método imunoenzimático (ELISA) os níveis plasmáticos de IL-6 e IL-1β, IL-17, e TNF-α na próstata de camundongos senis FVB e TRAMP submetidos aos tratamentos com Goniotalamina e Celecoxibe, considerando o efeito sistêmico dessas drogas;
- Avaliar a proliferação celular através da marcação do antígeno nuclear de proliferação celular PCNA nos grupos TRAMP de diferentes períodos de resposta aos tratamentos com Goniotalamina e Celecoxibe, e animais jovens e senis (FVB) submetidos aos mesmos tratamentos;
- e. Avaliar a incidência de células apoptóticas através da técnica de TUNEL nos grupos
   TRAMP de diferentes períodos de resposta ao tratamento com Goniotalamina e
   Celecoxibe, e animais senis (FVB) submetidos aos mesmos tratamentos;
- f. Correlacionar à ocorrência de processos inflamatórios e as alterações prostáticas através das diferentes técnicas supracitadas avaliando os efeitos preventivos ou não do Celecoxibe e da Goniotalamina nos camundongos senis FVB eTRAMP;

g. Propor um método de avaliação fundamentado na comparação do perfil metabolômico da próstata de animais senis FVB e TRAMP, para detecção de possíveis marcadores metabólicos que caracterizem precocemente o potencial para o desenvolvimento de lesões malignas;

#### **3. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS**

#### 3.1. Animais e Procedimento Experimental

No presente trabalho foram utilizados camundongos machos da linhagem FVB e camundongos machos transgênicos da linhagem TRAMP (C57BL/6-Tg(TRAMP)8247Ng/J X FVB/NJ)F1/J obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/ UNICAMP). Todos os animais obtidos do CEMIB receberam água e ração *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil) e foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Celular e Estrutural (Área de Anatomia) do Instituto de Biologia até atingirem a idade experimental para cada tratamento. (Os camundongos da linhagem TRAMP foram importados e tiveram a colônia instalada na UNICAMP através do projeto Fapesp 2010-51112-5). Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) - UNICAMP/ Protocolo: 3119-1.

a. <u>Grupo Jovem/Controle (JV)</u>: Camundongos FVB com 12 semanas de idade (n=20) foram subdivididos em dois grupos, onde 10 animais receberam por gavagem carboximetilcelulose 0,5% e 10 animais tampão fosfato salino (PBS), durante 30 dias.

-Para técnica de Ressonância Magnética Nuclear foram utilizados 18 camundongos FVB com 18 semanas de idade, os quais não receberam nenhum tratamento.

b. <u>Grupo Senil/Controle (SENIL)</u>: Camundongos FVB com 52 semanas de idade (n=20) foram subdivididos em dois grupos, onde 10 animais receberam por gavagem carboximetilcelulose 0,5% e 10 animais tampão fosfato salino (PBS), durante 30 dias.

-Para técnica de Ressonância Magnética Nuclear foram utilizados 18 camundongos senis FVB com 52 semanas de idade, os quais não receberam nenhum tratamento.

c. <u>Grupo Senil/Goniotalamina (SNGTN):</u> Camundongos FVB com 52 semanas de idade (n=15) receberam por gavagem 150mg/Kg/dia de Goniotalamina racêmica diluída em PBS 3 vezes por semana, durante 30 dias (modificado de Vendramini-Costa et al., 2010)

d. <u>Grupo Senil/Celecoxibe (SNCEL)</u>: Camundongos FVB com 52 semanas de idade (n=15) receberam por gavagem 10mg/Kg/dia da droga Celecoxibe (Celebra® - Laboratórios Pfizer Ltda.) suspenso em carboximetilcelulose 0,5%, durante 30 dias (modificado de Sozer et al., 2011).

e. <u>Grupo TRAMP Controle 8 (T8)</u>: Camundongos TRAMP com 8 semanas de idade (n=20) foram divididos em dois grupos, onde 10 animais receberam carboximetilcelulose 0,5% e 10 animais tampão PBS diluído, ambos por gavagem, durante 30 dias.

- Para técnica de Ressonância Magnética Nuclear foram utilizados 18 camundongos TRAMP com 8 semanas de idade, os quais não receberam nenhum tratamento.

f. <u>Grupo TRAMP Controle 12 (T12)</u>: Camundongos TRAMP com 8 semanas de idade (n=20) foram divididos em dois grupos, onde 10 animais receberam carboximetilcelulose 0,5% e 10 animais tampão PBS diluído, ambos por gavagem, durante 30 dias. <u>Os animais foram eutanaziados logo após atingirem 12 semanas de idade.</u>

-Para técnica de Ressonância Magnética Nuclear foram utilizados 18 camundongos TRAMP com 12 semanas de idade, os quais não receberam nenhum tratamento.

g. <u>Grupo TRAMP /Celecoxibe (T1CEL)</u>: Camundongos TRAMP com 8 semanas de idade (n=15) receberam por gavagem 10 mg/Kg/dia da droga Celecoxibe (Celebra® - Laboratórios Pfizer Ltda.) suspenso em carboximetilcelulose 0,5%, durante 30 dias (modificado de Sozer et al., 2011). Os animais foram eutanaziados logo após o término do tratamento.

h. <u>Grupo TRAMP/Goniotalamina (T1GTN)</u>: Camundongos TRAMP com 8 semanas de idade (n=15) receberam por gavagem 150mg/Kg/dia de Goniotalamina racêmica diluída em tampão fostato salino (PBS) 3 vezes por semana, durante 30 dias (modificado de Vendramini-Costa et al., 2010). Os animais foram eutanaziados logo após o término do tratamento.

i. <u>Grupo TRAMP Controle 2 (T22)</u>: Camundongos TRAMP com 8 semanas de idade (n=20) foram divididos em dois grupos, onde 10 animais receberam carboximetilcelulose 0,5% e 10

animais tampão PBS diluído, ambos por gavagem, durante 30 dias. <u>Os animais foram</u> eutanaziados logo após atingirem 22 semanas de idade.

j. <u>Grupo TRAMP /Celecoxibe (T2CEL)</u>: Camundongos TRAMP com 8 semanas de idade (n=10) receberam por gavagem 10 mg/Kg/dia da droga Celecoxibe (Celebra® - Laboratórios Pfizer Ltda.) suspenso em carboximetilcelulose 0,5%, durante 30 dias (modificado deSozer et

al., 2011). Os animais foram eutanaziados logo após atingirem 22 semanas de idade.

k. <u>Grupo TRAMP 2/Goniotalamina (T2GTN)</u>: Camundongos TRAMP com 8 semanas de idade (n=15) receberam 150mg/Kg/dia de Goniotalamina racêmica diluída em tampão fostato salino (PBS) em dias alternados, durante 30 dias (modificado de Vendramini-Costa et al.,

#### 2010). Os animais foram eutanaziados logo após atingirem 22 semanas de idade.

Após 30 dias de tratamento, todos os animais foram pesados em balança analítica Denver P-214 (Denver Instrument Company, Arvada, CO, EUA), anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (5mg/kg i.m.; König, São Paulo, Brasil) e Cloridrato de Cetamina 10% (60mg/kg, i.m.; Fort Dodge, Iowa, EUA) e eutanaziados.

Amostras do lobo ventral foram coletadas de todos animais de cada grupo experimental, e submetidas às análises morfológicas em microscopia de luz, Imunoistoquímicas, ELISA, TUNEL, Western Blotting e Ressonância Magnética Nuclear.

#### 3.2. Análise Morfológica

Amostras prostáticas de 5 animais de cada grupo foram coletadas e fixadas em solução de Bouin ou paraformoldeído 4%. Após a fixação, os tecidos foram lavados em etanol a 70%, com posterior desidratação em série crescente de alcoóis (80%, 95%, 100%). Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em xilol por 2 horas e inclusos em parafina e polímeros plásticos (Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA). Em seguida, os materiais foram seccionados no micrótomo Hyrax M60 (Zeiss, Munique, Alemanha) com espessura de 5µm, corados em Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson (Junqueira et al., 1979) e fotografados no fotomicroscópio Nikon Eclipse E-400 (Nikon, Tóquio, Japão).

Para os camundongos TRAMP, exclusivamente, foi realizada uma classificação histológica para os diferentes graus de lesões encontradas na próstata baseada em partes das descrições feitas por Roy-Burman et al., (2004). Para cada animal foram capturados 10 campos aleatórios no aumento de 40x, os quais foram divididos em 4 quadrantes. Em cada quadrante foi classificada a característica morfológica predominante segundo as seguintes especificações: 1- tecido normal; 2- neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau; 3- neoplasia intraepitelial prostática de alto grau; 4- adenocarcinoma bem diferenciado; 5- adenocarcinoma indiferenciado. Assim, foi estabelecida a porcentagem de cada uma das lesões para cada grupo experimental

#### 3.3. Análise Morfométrica

Na análise morfométrica realizada no presente estudo foram utilizadas as mesmas imagens para contagem dos diferentes graus de lesões na próstata ventral de camundongos TRAMP. O programa Imaging Software NIS-Elements foi utilizado para medir a área do núcleo e citoplasma em regiões saudáveis e hiperplásicas em imagens fotografadas na objetiva de 40X. Para cada grupo experimental 800 células epiteliais pertencentes a regiões saudáveis e 800 células epiteliais pertencentes a regiões hiperplásicas foram medidas.

#### 3.4. Imunoistoquímica

Amostras prostáticas de 5 animais de cada grupo experimental, os mesmos utilizados para a microscopia de luz, foram utilizadas para as imunomarcações. Os cortes foram obtidos com 5  $\mu$ m de espessura no micrótomo Hyrax M60 (Zeiss, Munique, Alemanha), coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C em microondas ou tratamento com proteinase K, dependendo das características de cada anticorpo. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0,3% em metanol) com posterior incubação em solução bloqueadora com albumina soro bovino (BSA) 3%, em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os diferentes antígenos (Tabela 1) foram localizados e diluídos em BSA 1% e armazenados

overnight a 4 °C. O kit Envision HRP (Dako Cytomation Inc., EUA) foi usado para detecção dos antígenos, de acordo com as instruções do fabricante. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário HRP conjugado proveniente do kit Envision (Dako) por 40 minutos e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB), contra-corados com Hematoxilina de Harris e avaliados no fotomicroscópio Nikon Eclipse E-400 (Nikon, Tóquio, Japão). A marcação positiva para cada antígeno foi determinada pela presença da coloração acastanhada da reação do DAB, e baseada na análise 10 campos não sobrepostos para cada animal. A imunoreatividade foi graduada qualitativamente de acordo com a porcentagem de área imunomarcada, sendo classificada como: 0 (zero) para coloração negativa (0%), 1 como coloração fraca (<33%), 2 para coloração moderada (33%-66%) e 3 para coloração intensa (>66%) de acordo com a frequência da marcação dos antígenos nas secções de tecido prostático (modificado de Tuxhorn et al., 2002a; Tuxhorn et al., 2002b; Tomas and Kruslin, 2004). Para todas análises Imunoistoquímicas foi realizado o controle negativo, no qual o anticorpo primário não é utilizado.

#### 3.5. Extração de Proteínas e Western Blotting

Amostras do lobo ventral foram coletadas de 5 animais de cada grupo experimental e pesadas, homogeneizadas através do homogeneizador Polytron (Kinematica) por 1 min em 50 μl/mg de tampão de extração RIPA contendo 10% (v/v) Triton X-100 e 10 μl/ml de cocktail inibidor de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). Os extratos dos tecidos foram obtidos por centrifugação durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. Uma alíquota de cada amostra foi usada para determinação da concentração de proteínas, usando o reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.,USA). As amostras foram misturadas (1:1) com tampão de amostra 3X (100mM Tris-HCl pH 6.8, 10%β-mercaptoetanol, 4% SDS e20% glycerol), incubadas em banho seco a 100°C por 5 minutos. O correspondente a 50 microgramas de proteínas foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente (Sistema Hoefer) para membranas de nitrocelulose (Amersham) a 120 V por 1 hora e meia. As membranas foram então bloqueadas com BSA

3% diluído em TBS-T por uma hora e incubadas com os anticorpos primários (Tabela 1) com diluição variando entre 1:500- 1:1000. Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários *anti-rabbit* e *anti-mouse* HRP conjugados na diluição de 1:4000 em BSA 1%. Após nova série de lavagens com TBS-T, foi acrescentado 2 ml de solução quimioluminescente (Super Signal West Pico Chemiluminescent/ThermoScientific/ 34080) e a atividade da peroxidase foi revelada por um sinal luminescente das bandas de Western Blotting , as quais foram capturadas pelo equipamento GeneGnome (Syngene, Cambridge, UK). As intensidades da marcação obtidas para as diferentes moléculas foram determinadas por densitometria através do programa de análise de imagens Image J (Image Analysis and Processing in Java). β-actina foi usado como controle endógeno interno.

 Tabela 1. Anticorpos utilizados nas ténicas de Imunoistoquímica (IHC) e western blotting

 (WB)

Anticorpo	Especificações	Diluição
AR	sc-816, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA),	1:50 (IHC) / 1:500 (WB)
BCL-2	#3869 - Cell Signaling Biotechnology, Danvers, EUA.	1:500 (WB)
COX-2	sc-376861- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA.	1:50 (IHC) / 1:500 (WB)
Goat anti-mouse (secundário)	W4021, Promega Corporation, Madison, WI, EUA	1:100 (IHC) / 1:4000- 6000 (WB
Goat anti-mouse (secundário)	W4018, Promega Corporation, Madison, WI, EUA	1:100 (IHC) / 1:4000- 6000 (WB
IGFR-1	sc-712- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA.	1:50 (IHC) / 1:500 (WB)
IL-17	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA.	1:50 (IHC)
iNOS	ab136918- Abcam, Cambridge, MA, EUA.	1:50 (IHC) / 1:500 (WB)

NFkB	ab 13594- Abcam, Cambridge, MA, EUA.	1:500 (WB)
PCNA	ab-29 – Abcam, Cambridge, MA, EUA.	1:300 (IHC) / 1:500 (WB)
Phospho-NfkB p65	#3033- Cell Signaling Biotechnology, Danvers, EUA.	1:500 (WB)
Phospho-STAT3	3E2, Cell Signaling Technology, Danvers, EUA.	1:500 (WB)
STAT-3	sc-7179 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA.	1:50 (IHC) / 1:500 (WB)
TNF-α	ab8348- Abcam, Cambridge, MA, EUA.	1:250 (WB)
β-actina	sc 81178- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA.	1:500 (WB)

#### 3.6. Dosagens de IL-6, IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-17 por método imunoenzimático (ELISA)

Amostras de sangue foram centrifugadas (centrifuga refrigerada Sigma® 3-18K) a 3000 rpm, por 10 minutos. O plasma obtido foi utilizado para determinar a dosagem de IL-6, IL1-β, TNF-α e IL-17 utilizando-se reagentes comerciais pelo método imunoenzimático (Quantikine®, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). As absorbâncias das amostras foram lidas utilizando-se o equipamento Multi-Mode Microplate Reader Model Synergy H1M (Bio-Tek Instruments) com comprimento de onda de 450 nm.

#### 3.7. PCNA

A imunomarcação de PCNA foi utilizada no presente estudo como marcador de proliferação celular. As amostras prostáticas foram as mesmas utilizadas na análise Imunoistoquímica para as demais proteínas avaliadas. Para o artigo I o experimento foi baseado no sistema de multipontos de Weibel (1963) com 710 pontos de intersecção. Então, 10 imagens aleatórias de cada animal foram capturadas no aumento de 40X. A quantificação de células positivas para PCNA foi determinada pela coloração nuclear marrom e, em seguida, os valores foram gerados pela contagem de imunoreatividade que coincidia com a intersecção grade e, divididos pelo número total de pontos. O resultado foi expresso em frequência relativa

de marcação positiva para PCNA em todos os grupos experimentais. Para o artigo III devido o PCNA foi marcado através da técnica de Western Blotting.

#### 3.8. TUNEL

Amostras do lobo ventral de 5 animais foram coletadas e fixadas em paraformoldeído a 4%. A fragmentação do DNA de células apoptóticas foi detectada pelo sistema de TUNEL (Dead End™ Fluorometric TUNEL System, Promega, Madison WI, USA), de acordo com as intruções do fabricante. As células apoptóticas foram identificadas e capturadas pelo fotomicroscópio invertido Olympus IX71 inverted-II (Olympus, California, USA) equipado com sistema de fluorescência. Para a análise, 10 campos aleatórios para cada animal foram capturados no aumento de 40x. Para o artigo I a quantificação das células em apoptose foi similar ao método utilizado para contagem de células positivas para PCNA para a linhagem de camundongos TRAMP. O resultado foi expresso em frequência relativa de marcação fluorescente positiva em todos os grupos experimentais. Já para o artigo III o resultado foi expresso através do índice apoptótico,

#### 3.9. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

#### 3.9.1. Protocolo de extração para próstata ventral de camundongos.

As amostras da próstata ventral foram agrupadas em *pools*, uma vez que a quantidade de tecido de uma única amostra foi insuficiente para leitura de RMN. Sendo assim, cada grupo experimental apresentou pelo menos 4 *pools* compostos de 3 amostras cada. Após a formação dos *pools*, as amostras foram pesadas novamente e homogeneizadas no Polytron (Kinematica) em metanol (8mL/g) e água milliQ gelada (8mL/g). Posteriormente, clorofórmio (8mL/g) e água milliQ gelada (4mL/g) foram adicionados na mistura e agitados no vortex por 60s. O extrato permaneceu no gelo por 10 minutos e em seguida foi centrifugado durante 5 minutos a 2000G (4°C). Após a centrifugação, as amostras apresentaram duas frações, das quais somente a fração polar (superior) foi aliquotada e acondicionada a -80°C. Para a preparação da leitura as amostras foram liofilizadas por pelo menos 18 horas.

# 3.9.2. Preparação das amostras para leitura no espectrômetro de ressonância magnética nuclear.

Para referência de concentração (visando a quantificação dos metabólitos) foi preparada uma solução estoque de TSP (ácido 3-(trimetil-silil)-2,2',3,3'- tetradeuteropropiônico ou TMSP-d4) a 50 mmol/L em água deuterada (D<sub>2</sub>O), armazenada ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Assim, os extratos liofilizados foram ressuspendidos em 540µL de D<sub>2</sub>O (dissolução do liofilizado); 60µL de tampão fosfato 1 mol/L em D<sub>2</sub>O (padronização do pH); 6,06µL de solução de TSP 50 mmol/L (referência interna). O resultado foi uma solução final de 600,6µL em D<sub>2</sub>O, com concentrações de 0,5mmol/L de TSP e 100mmol/L de tampão fosfato (Canevarolo, 2012).

#### 3.9.3. Parâmetros do espectro de ressonância magnética nuclear

A sequência de pulsos "1Dpresat" é a mais usual das sequências de pulsos de uma dimensão e foi empregada nesta análise. Foram realizados 1024 scans, com intervalos entre scans ("*delays*") de 1,5 segundos, janela de leitura de 16 ppm, tempo de aquisição de 4 segundos e 25º C de temperatura. O espectro também foi normalizado pelo valor de TSP, um aditivo que é utilizado como referência interna. Os picos observados foram identificados e o software Chenomx NMR Suite (Versão 7.1; Chenomx Inc., Edmonton, Canadá), foi utilizado para o tratamento dos dados obtidos e para análise qualitativa e quantitativa dos metabólitos presentes na amostra.

#### 3.10. Análise Estatística

Paras a análise estatística foram empregados o test-t, e análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação entre médias.

Os testes estatísticos realizados exclusivamente para análise de RMN foram realizados na plataforma online Metaboanalyst. Foram empregadas análises de variância ANOVA, testes da análise de componentes principais (PCA), e análise de discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Antes da realização das análises multivariadas os dados foram
normalizados pela área. Para tal, cada valor das variáveis de uma amostra foi dividido pela somatória dos valores de todas as variáveis daquela mesma amostra, tornando-as comparáveis entre si (Canevarolo, 2012).

Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5%. (Zar, 1999).

# 4. ARTIGO CIENTÍFICO I

Publicado no periódico Endocrine Related Cancer 2016 Apr;23(4):235-50. doi: 10.1530/ERC-15-0540

# 1. TITLE

Anti-inflammatory therapies in TRAMP mice: delay in prostate cancer progression Short running title: Therapies in prostate cancer.

Larissa Akemi Kido<sup>1</sup>, Fabio Montico<sup>1</sup>, Rafael Sauce<sup>1</sup>, Aline Barbosa Macedo<sup>1</sup>, Elaine Minatel<sup>1</sup>, Débora Barbosa Vendramini Costa<sup>3,4</sup>, João Ernesto de Carvalho<sup>2,3</sup>, Ronaldo Aloise Pilli<sup>4</sup>, Valeria Helena Alves Cagnon<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil;

<sup>3</sup> Chemical, Biological and Agricultural Pluridisciplinary Research Center, CPQBA, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil;

<sup>4</sup> Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil;

#### 2. ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the immediate and late responses of prostatic cancer in structural and molecular biology in the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate mice (TRAMP), after Goniothalamin and Celecoxib treatments. The treated mice received Goniothalamin (150mg/Kg, gavage) or Celecoxib (10mg/Kg, gavage) from 8 to 12 weeks of age, which were sacrificed at different ages; the immediate response groups at 12 weeks old and the late response groups at 22 weeks old. The ventral prostate was collected for light microscopy, immunohistochemistry, Western Blotting, TUNEL and ELISA. Morphological analyses indicated that Goniothalamin treatment delayed the prostatic adenocarcinoma progression, leading to a significant decrease of prostatic lesion frequency in both experimental period responses to this treatment, mainly high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and well-differentiated adenocarcinoma. Also, the Celecoxib treatment showed a particular decrease in the proliferative processes (PCNA) in both experimental periods. Despite Celecoxib diminishing the COX2 and IGFR1 levels, Goniothalamin presented higher action spectrum considering the decrease of a greater molecular number involved in the proliferative and inflammatory processes in prostatic cancer. Goniothalamin attenuated the pro-inflammatory response in TRAMP prostatic microenvironment, delaying prostate cancer progression. Celecoxib treatment was efficient in the COX2 regulation in the TRAMP mice, mainly in the advanced disease grade. Finally, we concluded that inflammatory process control in prostate cancer early grades was crucial for the down regulation of the signaling pathways involved in the proliferative processes in advanced cancer grades.

**Key-words:** inflammation; prostate cancer; TRAMP, anti-inflammatory therapies, Goniothalamin

#### **3. INTRODUCTION**

Cancer is one of the greatest public health concerns not only in the USA but also in other countries. Prostate cancer (PCa) is the second main cause of death among men, estimating around 220,800 new cases and 27,540 deaths in 2015 in USA (Siegel *et al.* 2015).

The relationship between chronic inflammation and increased PCa development has been investigated over the past few years. And, studies have demonstrated the association between inflammatory cell occurrence and its mediators in the prostatic microenvironment, not only in the PCa precursor lesions, but also in the early PCa grades (De Marzo, *et al.* 1999, Nelson *et al.* 2003, Hamid *et al.* 2011, Thapa & Ghosh 2015).

The imbalance between the cellular proliferation mechanism and apoptosis in the PCa is directly influenced by glandular tissue response to pro-inflammatory cytokines, growth factors and steroid hormones, creating a permissive microenvironment for neoplastic process development (Hamid *et al.* 2011). In addition, it is well-known that the tissue microenvironment is a fundamental compound for tumor development and maintenance, thus, knowledge about this is relevant to evaluate the carcinogenesis process in clinical trials (Bissell & Hines 2011).

Therefore, taking into consideration the prostatic lesions and chronic inflammation, studies have evaluated therapeutic alternatives for both prostatic lesion prevention and contention, particularly PCa, by means of inflammation controller agents. Among them, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID's) have been tested for cancer chemoprevention in both human beings and other animal species (Rodriguez & Gonzalez-Perez 2004). In addition to this, similar to other COX2 blockers, Celecoxib acts on inflammation control, decreasing angiogenesis and cellular proliferation, also inducing apoptosis mechanisms (Sobolewski *et al.* 2010, Gravitz 2011). However, the extended periods of COX2 blocker use have been questioned due to the increase of cardiotoxic risk, suggesting the necessity for constant collateral effect evaluation, not only in therapies using one drug but also in case of drug association (Gravitz 2011, Jendrossek 2013).

Regarding Goniothalamin (GTN), a styryl lactone compound isolated from plants of the *Goniothalamus* genus and found in an enantiomeric form (R), it has demonstrated selective toxicity against different cancer cell lineages (Sam *et al.* 1987, Al-Qubaisi 2011). According to Vendramini-Costa *et al.* (2010) both enantiomerically pure (R) and racemic (racGTN) forms showed antiproliferative features in an Ehrlich solid tumor model mice.

Transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model (TRAMP), which was used in the study herewith, expresses viral SV40 oncoprotein in the prostatic luminal cells under the control of a rat androgen-responsive probasin promoter-gene, blocking the activity of important tumor supressor genes (Greenberg *et al.* 1995, Gingrich *et al.* 1999, Huss *et al.* 2003). This animal model develops prostatic hyperplasia which was graded as prostatic neoplasia intraepithelial (PIN) from 6 to12 weeks old and well-differentiated adenocarcinoma from 10 to 16 weeks old, and also primary and metastatic tumors from 18 to 24 weeks old (Greenberg *et al.* 1995, Gingrich *et al.* 1999).

Thus, taking into consideration the involvement of the inflammatory process in PCa development and progression, we suggest that the use of drugs that show preventive action in the inflammation and proliferation control could be a promising target in chemoprevention cancer therapies. So, GTN therapy in the TRAMP mice model arose from the necessity not only of evaluating the inflammatory role in prostate tumor growth in different drug evaluation periods, but also of comparing the anti-inflammatory and anti-carcinogenic effects in relation to a widely known NSAID, Celecoxib.

The aim herein was to characterize the structural and molecular biology of the ventral lobe of the prostate considering the inflammatory process, as well as the immediate and late glandular responses to Goniothalamin and Celecoxib treatments in cancer development and progression in the TRAMP mice model.

#### 4. MATERIALS AND METHODS

#### Animals

All male transgenic TRAMP mice (C57BL/6-Tg (TRAMP) 8247Ng/JX FVB/Unib) F1/J) used in this study were divided into seven experimental groups. The control animals (T8, T12; T22) were treated (gavage) with carboxymethyl cellulose (CMC) 0.05% or phosphate-buffered

saline (PBS) + 1% Tween 80 (10mL/Kg) vehicles) (n=60). The T1GTN and T2GTN groups both received 150mg/Kg Goniothalamin (gavage) (modified Vendramini-Costa et al. 2014), three times a week for 30 days only (in mice from 8 to 12 weeks old) and all the animals in both groups were sacrificed at different ages (T1GTN: at 12 weeks of age and T2GTN: at 22 weeks of age) (Supplementary Fig. 1). The T1CEL and T2CEL groups were treated (gavage) with 10mg/Kg Celecoxib (modified Sozer *et al.* 2011), five times a week for 30 days only (in mice from 8 to 12 weeks old) and all the animals in both these latter groups were sacrificed at different ages (T1CEL: at 12 weeks of age) (Supplementary Fig. 1). The T1CEL and T2CEL groups were sacrificed at different ages (T1CEL: at 12 weeks of age and T2CEL: at 22 weeks of age) (Supplementary Fig. 1). All mice were provided by the Multidisciplinary Center for Biological Investigation on Laboratory Animal Science (CEMIB) at the University of Campinas (UNICAMP) and received water and solid diet *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brazil). Ethics Committee Animal Use (CEUA) - UNICAMP/ Protocol: 3119-1.

# Drugs

Goniothalamin was prepared according to a published procedure (de Fatima *et al.* 2005) and it was emulsified with 1% Tween 80 (Synth, Diadema, SP, Brazil) and dissolved in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.0 (Vendramini-Costa *et al.* 2014). Celecoxib was from CELEBRA (Pfizer Pharmaceuticals LLC, Caguas, Puerto Rico), and diluted in CMC 0.05% (Sozer *et al.* 2011). The acute toxicity of GTN was evaluated in a previous study (Vendramini-Costa *et al.* 2010).

## Morphological analysis

Ventral prostate samples were collected from five animals and fixed in Bouin's solution for 24 h. Then, tissues were rinsed in 70% ethanol, dehydrated and embedded in paraffin and plastic polymers (Paraplast®, Sigma Aldrich,St Louis, MO,USA). The samples were cut in the Hyrax M60 microtome (Zeiss, Munich, Germany) and then stained with hematoxylin–eosin and Masson's Trichrome (Junqueira *et al.* 1979). The slides were photographed with a Nikon Eclipse E-400 photomicroscope (Nikon, Tokyo, Japan). For each animal, 10 random fields were captured at 40X magnification, which were divided into 4 quadrants. Then, in each quadrant the predominant morphological feature was classified according to the following specifications: 1. Normal tissue (NT); 2. Low-grade prostatic intraepithelial neoplasia (LGPIN); 3. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN); 4.Well-differentiated adenocarcinoma and 5. Undifferentiated adenocarcinoma (Fig. 1a-d). Thus, the percentage of each lesion for each experimental group was established. The morphological classification of different degrees of prostatic lesions in TRAMP mice was partially based on descriptions made by (Roy-Burman *et al.* 2004). Presence of undifferentiated adenocarcinoma was calculated considering the total number of 22 week old mice (Fig. 1d).

# Morphometric analyses (Nuclear and cytoplasmatic areas)

Morphometric analysis was performed, using Imaging Software NIS-Elements to measure nucleus and cytoplasm areas in healthy and hyperplasic tissues. For each experimental group, 800 cells in healthy regions and 800 cells in hyperplasic regions were measure.

# Immunohistochemistry

Prostate ventral lobe samples were collected from five animals in each experimental group, the same used for light microscopy analyses. The COX2, STAT3, IGFR1, antigens were detected, respectively, using the following antibodies: mouse monoclonal anti COX2 (sc-376861- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, United States of America), rabbit polyclonal anti-STAT3 (sc-7179 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit polyclonal anti-IGFR1 (sc-712- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), mouse monoclonal anti-PCNA (ab-29 – Abcam, Cambridge, MA, USA). The pattern protocols were the same as those described by Kido *et al.* (2014) and Montico *et al.* (2015) and all the primary antibodies were diluted in a 1:50, except for PCNA 1:250. Then, the sections were incubated for 2 hours with HRP-conjugated secondary antibodies, goat anti-mouse IgG (W4021, Promega Corporation, Madison, WI, EUA) and goat anti-rabbit IgG (W4018, Promega Corporation, Madison,WI, EUA). Subsequently, peroxidase activity was detected using a 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma Aldrich,St. Louis, MO, USA). Harris' hematoxylin was used for counter-staining. The DAB precipitate indicated positive antibody reaction and the frequency of antigen immunoreactivity was graded according to the frequency and positivity of antigens in sectioned tissues: 0 for negative staining (0%), 1 for weak staining (33%), 2 for moderate staining (33–66%), and 3 for intense staining (greater than 66%) (modified Tomas and Kruslin 2004; Tuxhorn, *et al.* 2002a; Tuxhorn, *et al.* 2002b). The immunohistochemical analyses were followed by a negative control parameter in which the primary antibody was not used.

# PCNA

PCNA immunolabelling was used in the present study as a cellular proliferation marker. The prostatic samples were the same used in the immunohistochemistry analysis for the other proteins. The experiment was carried out using the multipoint system (Weibel, 1963) with 710 intersection points. Ten random fields were captured at 40X magnification for each animal. PCNA positive cell quantification was determined by brown-stained nucleus count, coinciding with the grid intersection, divided by the total number of points. The result was expressed as the relative frequency of PCNA positive cells in all experimental groups.

# Apoptosis

The DNA fragmentation from apoptotic cells was detected by Dead End<sup>™</sup> Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Apoptotic nuclei were identified and photographed using an Olympus IX71 inverted-II microscope, equipped with a fluorescence system (Olympus, California, USA). Ten random fields were captured at 40X magnification for each animal. The quantification for apoptotic cells was similar to PCNA, following the same counting method. The result was expressed as relative frequency of apototic cells in all experimental groups.

# Western Blotting

Prostate ventral lobe samples from five animals were frozen and then homogenized by the Polytron homogenizer (Kinematica Inc., Lucerne, Switzerland) in a diluted RIPA extraction buffer (Millipore, Temecula, CA, USA) and protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA). The ventral prostate extracts were centrifuged at 14000 rpm for 15 min at 4 °C, and then protein quantification using Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) was performed. A total of 50µg protein was applied and separated by electrophoresis to the SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions. Subsequently, the proteins were electrically transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL, USA). The membranes were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) diluted in tris-buffered saline and tween 20 (TBS-T) for 1h and incubated overnight with the primary antibodies in a dilution range of 1:350-1:500: mouse monoclonal anti COX2 (sc-376861, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), mouse monoclonal anti NFkB (ab 13594, Abcam, Cambridge, MA, USA), mouse monoclonal phosphoSTAT3 (3E2, Cell Signaling Technology, Danvers, USA), rabbit polyclonal anti- IGFR1 (sc-712, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA,USA). After that, the membranes were incubated for 2h with secondary HRP conjugate anti-rabbit and anti-mouse antibodies in a dilution range of 1:4000–1:6000 in 1% BSA. The bands were detected by chemiluminescence solution (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) for 5 min and captured using Gene Gnome equipment and the GeneSys image acquisition software (Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK). The antibody for mouse monoclonal anti beta-actin (sc-81178, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was used as endogenous control. The intensity of antigen bands was guantified 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.

# ELISA

Blood samples were centrifuged (Sigma® 3-18K refrigerated centrifuge) at 3000 rpm for 10 minutes. The plasma obtained was used to determine TNF-alpha (KMC3012), IL-1beta

(KMC0012), IL-17 (KMC3021) and IL-6 (KMC0062) concentrations using commercial reagents for the enzyme immunoassay (Novex®, Life Technologies Corporation, Grand Island, NE, USA).Sample absorbance was read using Multi-Mode Microplate Reader Model Synergy H1M equipment (Bio-Tek Instruments, Inc.,Winoosk, VT, USA) at a 450 nm wave length.

# **Statistical analysis**

The statistical analysis for prostatic lesion incidence (morphology, PCNA and Tunel) and protein levels among the experimental groups was carried out by variance analysis (ANOVA) followed by Tukey's multiple range test or t-student test, with the level of significance set at 5 % (Zar 1999). The results were expressed as the mean ± standard deviation.

# 5. RESULTS

# Goniothalamin and Celocoxib treatments delay the prostate adenocarcinoma development

The prostatic tissue from control TRAMP mice (8 and 12 week old mice) showed predominantly lesions characterized as LGPIN and HGPIN (Fig. 2a-e; Supplementary Fig. 2a, b). These lesions presented epithelial cell stratification, occupying different extension in the acinus lumen. The hyperplastic epithelial cells presented a significant increase of nuclear and cytoplasmatic areas (Supplementary Fig. 3a, c), evident nucleoli and chromatincondensation. Also, rare hyperplastic epithelial cell herniation regions toward the underlying smooth muscle cell layers were identified. The HGPIN frequency was greater (p<0.05) in the T12 group than in the T8 group, showing 25 % and 7%, respectively (Fig. 4e). The prostatic stroma in the T8 control group showed fibrocellular features with smooth muscle cells, collagen fibers placed concentrically around of the prostatic acini, in addition to blood vessels (Fig. 2a, b). Also, thick fibromuscular layer areas, around of epithelial proliferation were verified. The prostatic stroma changes were similar between T8 and T12 control groups, however the frequency of these lesions was higher as old as the mice (Fig 2a-e).

The immediate response to GTN treatment showed maintenance of prostatic tissue morphology, highlighting the incidence 7.5% HGPIN and 2.5% well-differentiated adenocarcinoma (p<0.05), in contrast to the T12 control group with 25% and 9.5%, respectively (Fig. 2c-g; 4e, g). These results were confirmed by means of a significant decrease in PCNA immunolabeling (p<0.0001) and an increase in apoptotic cells (p<0.001) (Fig. 5c; 6c). Moreover, scarce prostatic stroma was verified in comparison with T8 and T12 control groups, showing decreased fibrillar elements frequency, as well as hypertrophy and hyperplastic areas (Fig. 2f, g; Supplementary Fig. 2e).

The immediate response to Celecoxib anti-inflammatory treatment (T1CEL) did not indicate statistically significant decrease of the pre-malignant and malignant lesions (Fig.4a, c, e, g). However, in general, there was a decrease in the incidence of lesions when compared to the T12 control group (Fig. 2h, i, j; Supplementary Fig. 2f). Additionally, PCNA immunohistochemistry showed a significant reduction of the proliferative process (p<0.0001), and TUNEL showed a significant increase of apoptotic cells (p<0.001) (Fig 5d; 6d). The morphological analyses also confirmed the prostatic lesion progression delay as well as the occurrence of occasional epithelial atrophied regions and reduction of folded acinar mucosa. The prostatic stroma showed structural features similar to those seen in the immediate response of the GTN treatment (Fig. 4h, i, j; Supplementary Fig. 2f).

Different ventral prostate lesion grades were identified in the TRAMP 22 cancer control group (T22), particularly HGPIN, well-differentiated adenocarcinoma and undifferentiated adenocarcinoma (Fig. 3a-d). The HGPIN lesion showed the highest frequency in this group, 48.5%, characterized by the occurrence of epithelial cell stratification within the acinar lumen (Fig. 3a, c; 4f). Furthermore, the well-differentiated adenocarcinoma was identified in 6% of the total area evaluated; showing atypical epithelial cells in the prostatic stroma (Fig. 4h).

Partial morphological prostatic tissue maintenance was verified in late response to GTN treatment (T2GTN), in relation to the T22 cancer group, thus delaying prostate cancer progression (Supplementary Fig. 2g). This is a fact, considering the significant increase of normal prostatic tissue (21.5%) and LGPIN frequency (45%) (p<0.05), as well as the significant

PCNA immunolabeling reduction (p<0.0001) (Fig. 3e, f, g; 4b, d; 5g). There was no significant lesion incidence decrease in late response to Celecoxib treatment in relation to the T22 cancer group (p>0.05). Nevertheless, significant PCNA immunolabeling reduction was seen (p<0.0001) (Fig. 5e, f, h). Despite identifying stromal recovery in the Celecoxib treatment, the tissue response was less intense than that found in GTN treatment (Fig. 3e-j; Supplementary Fig. 2h). Regarding the TUNEL evaluation, there was no significant difference in late response groups (Fig. 6g, h).

The undifferentiated adenocarcinoma quantification was performed only in the 22 week old mice groups, taking into consideration that the older the mice, the greater the occurrence of aggressive cancer (Fig 3b, d; Supplementary Fig. 2d). Undifferentiated adenocarcinoma was verified in 60% of mice in the T22 cancer group, in contrast to that observed in the late response to GTN and Celecoxib treatments, which represented 20% and 40%, respectively.

# Goniothalamin led to a decrease of the great majority of pro-inflammatory mediators evaluated in the ventral prostate lobe

COX2 expression increased according to lesion progression in the ventral prostate lobe in T8, T12 and T22 control groups (Fig. 7a, b; 8a, b; 9a). The Celecoxib treatment significantly reduced the COX2 protein levels in both immediate and late response groups (p<0.01 – p<0.001), highlighting the Celecoxib specific COX2 inhibition and the extremely significant results (Fig. 7a, b). GTN treatment also reduced levels of this enzyme in both evaluation periods (p<0.01). However, the late response to Celecoxib treatment exhibited better results than treatment with Goniothalamin in the same period, if considered the significance level. The immunohistochemistry evaluation in the different treatments also indicated decreased COX2 reactivity in relation to T8, T12 and T22 control groups (Fig. 8a, b, c, d; 9a, b, c; Supplementary Tables 1 and 2).

The immediate response to GTN treatment significantly reduced the NFkB protein level (p<0.01), whereas both Celecoxib treated groups (T1CEL and T2CEL) and the late response to GTN treatment (T2GTN) did not significantly reduce the NFkB protein level (Fig. 7c, d).

The pSTAT3 protein level dropped significantly only in the late response to GTN treatment (p<0.05) (Fig. 7e, f). The immunohistochemical evaluation indicated lower STAT3 in the epithelial compartment (cytoplasmatic immunolabeling) in the GTN immediate response (Fig. 8g; Supplementary Table 1). Regarding stromal compartment, STAT3 immunoreactivity decreased only in the immediate response to Celecoxib treatment. Whereas, pSTAT3 immunoreactivity (nuclear immunolabeling) decreased in the immediate and late responses to both treatments in the epithelial and stromal compartments (Fig. 8e, f, g, h; 9d, e, f; Supplementary Tables 1 and 2).

#### Goniothalamin effect on the IGFR1 in the different prostatic lesion development grades.

The immunohistochemical and protein level evaluation showed IGFR1 gradual increase in the ventral prostatic lobe in the T8 and T12 control groups (Fig. 7g, h; Fig. 8i, j; Supplementary Table 1). On the other hand, IGFR1 was reduced in the immediate responses in the GTN and Celecoxib treatments (Fig. 7g, 8i-I; Supplementary Table 1). IGFR1 protein levels did not change significantly (p>0.05) in the late response GTN and Celecoxib treatments (Fig. 7h). However, the immunohistochemical analyses verified that the T22 control group had a reduction in the IGFR1 reactivity in relation to the other control groups, T8 and T12 (Supplementary Table 1 and 2). This result was highlighted in the mice presenting undifferentiated adenocarcinoma.

## Goniothalamin led to decreased IL-1beta and TNF-alpha plasmatic level in TRAMP mice

TNF-alpha and IL-1beta concentrations significantly reduced (p<0.001, p<0.001) immediately after GTN treatment (Fig. 10a, c). IL-6 e IL-17 plasmatic levels did not show a significant statistically difference among the groups (T8: 8.7  $\pm$  0.4 pg/mL; T12: 8.87  $\pm$  3.2 pg/mL; T1GTN: 8.33  $\pm$  3.0 pg/mL; T22: >35 pg/mL and T2GTN: 33,47  $\pm$  1.8 pg/mL), (T8: 19.94  $\pm$  5.8 pg/mL; T12: 16.88  $\pm$  0.8 pg/mL; T1GTN: 13.37  $\pm$  3.0 pg/mL; T22: 19.2  $\pm$  2.5 pg/mL and T2GTN: 17.72  $\pm$  4.7 pg/mL), respectively.

#### 6. DISCUSSION

Our results showed that GTN treatment delayed the prostatic adenocarcinoma progression, decreasing the glandular lesion incidence by means of pro-tumorigenic effect reduction related to inflammatory process. Despite Celecoxib diminishing the COX2, IGFR1 levels, GTN presented higher action spectrum considering the decrease of a greater molecular number involved in proliferative and inflammatory processes.

Inflammation is a tissue reaction that includes a series of responses from the immunological system, including the release of cytokines and recruitment of defense cells. Under normal conditions, inflammatory processes are solved by endogenous anti-inflammatory mediators, however, the persistent accumulation and activation of leukocytes can create a constant inflammatory condition (Hanada & Yoshimura 2002). According to the same authors, current clinical approaches are focusing on inhibition or suppression of pro-inflammatory mediators as a way to discovery new hallmarks and targets for inflammatory disease treatment.

Nowadays, different studies have shown the involvement of the inflammatory process in cancer development and progression, such as prostatic cancer (De Marzo et al. 1999, Hamid et al. 2011, Vendramini-Costa & Carvalho 2012, Thapa & Ghosh 2015). It is known that the prostatic inflammation etiology is multifactorial, involving infectious agents; factors related to aging; eating habits; among others (De Marzo, et al. 2007). Boehm et al. (1997) demonstrated that the acute inflammation in induced prostatitis increased the proliferative process of epithelial and stromal cells. Other studies verified inflammatory cell occurrence in the prostate of elderly animals due to aging process changes, highlighting the hormonal imbalance as a determining factor in triggering prostatic inflammation, particularly, when the estrogen level is higher than the testosterone level (Kido et al. 2014, Montico et al. 2011, Yatkin et al. 2009). In addition, the interaction between an inflammatory process and sexual hormones led to favorable conditions for androgen and estrogen activating lymphocytes, which are essential for the immune response in the prostatic tissue (Djavan, et *al.* 2009).

Therapies with different natural compounds, which show anti-inflammatory, antiproliferative and antioxidant properties, have been evaluated in various types of cancer (Cragg, et al. 2009). Studies in vitro indicated cytotoxic activity of the GTN natural enantiomer, especially in tumoral cell lineage, such as multiresistent breast cells, and also lung, melanoma, kidney, colon, ovary, and prostate cancers (de Fatima et al. 2005). Also, other studies demonstrated pro-apoptotic activity of the R-GTN by means of caspases pathway; increase of BAX pro-apoptotic protein expression; and nitric oxide synthase inhibition *al.* 2003, de Fatima et al. 2005). Vendramini-Costa et (NOS) (Inayat-Hussain et al. (2010) verified that racGTN, the same used in the study herein, showed antiedematogenic activity with simultaneous tumoral development inhibition in the solid tumor of Ehrlich. The same authors observed similar action between racGTN and the Piroxicam, non-steroidal antiinflammatory, by means of significant inhibition of the inflammatory edema in an Ehrlich tumor. These results indicated the racGTN anti-inflammatory action as being favorable to antiproliferative activity (Vendramini-Costa et al. 2010).

The results herein show that Celecoxib and GTN treatments led to proliferative process reduction in both experimental periods. Also, significant COX2 level reduction was detected in the ventral prostate of TRAMP mice in the different treatments. However, the Celecoxib action was more pronounced than GTN in the late response group, if considered the significance level.

Regarding the therapies, which have cancer chemopreventative action, epidemiological studies demonstrated a PCa development risk decrease in men treated regularly with nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (Mahmud et al. 2006, Daniels et al. 2009). Among the various types of NSAIDs, the selective inhibitors of COX2 can be highlighted as this enzyme is overexpressed in inflammatory processes and also in different cancers (Liu & Rose 1996, Tsujii et al. 1997, Kulkarni et al. 2001). It is well known that the COX2 overexpression, resulting from inflammatory process, increases the angiogenic factor production and the carcinogenic potential of cells by means of pro-carcinogenesis oxidation to carcinogenens, promoting thus cellular growth and decreasing the

apoptosis (Kirschenbaum et al. 2001, Hamid et al. 2011, Vendramini-Costa & Carvalho 2012). COX2 high levels related to proliferative lesions associated to inflammation suggest a risk factor for CaP development (Yatkin et *al.* 2009). According to Narayanan *et* al. (2006) Celecoxib administration, added to the diet for 16 weeks, resulted in a reduced PIN and adenocarcinoma incidence in the TRAMP mice model, due to an increase of apoptotic index and simultaneous pro-inflammatory mediator inhibition, such as NFkB p65 and COX2. The Celecoxib dose-dependent effects (400, 600, 1000 ppm) in the early grade of the neoplastic lesions indicated an important role in the prostatic tumoral growth prevention, showing the action mechanism of this anti-inflammatory (Narayanan et al. 2006). In the present study, the Celecoxib dose was lower than that used by Narayanan et al. (2006). In contrast to the results shown here, Vendramini-Costa (2015) did not identify a relation between GTN anti-inflammatory role and COX2 gene expression reduction. However, GTN inhibited prostaglandins inflammatory release, which is a by-product of COX2 action. Thus, we concluded that Celecoxib treatment was more efficient for COX2 enzyme control, particularly, during late response in relation to Goniothalamin treatment.

In addition, not only Celecoxib but also GTN treatment reduced IGFR1 immunoreactivity and protein level, evaluated immediately after both treatments, pointing to the relation between the inflammatory process control and the decreased mitogenic process. However, the evaluation in the late response to both treatments did not show any significant IGFR1 protein level reduction.

Montico *et al.* (2014) observed high level IGFR1 in the prostatic dorsolateral lobe in 12 and 22 week old TRAMP mice, similar to results found herein. The same authors verified the occurrence of tissue remodeling and mitogenic factors, involved in cellular invasion, and proliferation, and angiogenic processes, which are positive markers of pre-neoplastic lesion onset. In the great majority of cancers such as colon; endometrium; and breast; IGFR1 overexpression was associated to the agressive phenotype of the disease, such as therapy resistence (Wu & Yu 2014). The interaction between pro-inflammatory mediators and growth factors could stimulate the mitogenic action of these factors, such as the inflammatory prostaglandins in the increase of the IGF-1 binding sites (Hakeda, *et al.* 1991). Also, according to Kaplan *et al.* (1999) the loss of IGFR1 expression in advanced lesions could indicate the androgen-independent character of prostate cancer, in addition to metatstatic potential.

In the results herewith, the IGFR1 level maintenance in the late response groups, in both treatments, indicated mitogenic process persistence in the prostate of these animals, not suggesting however, an independent-androgen profile in the prostatic tumor. We concluded that both treatments interfered in IGFR1 regulation, being more efficient in immediate response groups and contributing to the inhibition of the proliferative process.

The results indicated dual and additional effects on the STAT3 and pSTAT3 pathways in the different periods of evaluation. The immunohistochemistry analysis demonstrated a STAT3 decrease, particularly in the prostatic cellular cytoplasm in the GTN immediate response group. On the other hand, there was a significant pSTAT3 level decrease in the GTN late response group. Regarding Celecoxib treatment, a decrease of pSTAT3 and STAT3 immunoreactivities was verified in both immediate and late responses to this drug. However, the pSTAT3 protein levels did not significantly decrease.

STAT3 activation maintenance has been associated to different cancers such as neck, breast, and lung, due to the chronic stimulation increase of inflammatory cytokine production, particularly from those of the IL-6 family, and to the decrease of the suppressor of the cytokine signaling (SOCS) expression, which are negative cytokine signaling regulators (Sansone & Bromberg 2012). Thereby, STAT3 is considered to be a cellular survival function regulator and a potent inducer of anti-apoptotic genes, such as *Bcl-2* and *Bcl-X* (Levy & Lee 2002). In CaP, STAT3 also acts as a key molecule in androgen receptor activation (AR), which is a potent regulator of cellular proliferation and survival, besides acting by means of alternative pathways, which do not need testosterone (Bishop, *et al.* 2014). According to Yang *et al.* (2005) STAT3 plays two distinct functions in the dependent transcription of cytokines; such as firstly being part of the primary response by means of STAT3 dimer action (product of tyrosine phosphorylation) and secondly, being part of a large amount of STAT3 unphosphorylated action. The same authors showed unphosphorylatedSTAT3 relevance in a transcription, as it

is required for cellular survival, growth and differentiation in *Cdc2*, *Cyclin B1*, *Mras* and *Ef21* gene overexpression, which increase in cancer.

Thus, we concluded that GTN acted in the STAT3 activity in both cytoplasmatic and nuclear levels in different periods of the treatment responses, interfering in the prostatic neoplastic lesions. Despite the Celecoxib treatment influencing STAT3 immunoreactivity, the GTN action led to stronger tissue responses in lesion progression delay, probably due to GTN interaction in various pathways, which are involved in the neoplastic process.

In addition, the results herein showed a significantly decreased NFkB protein level and also reduced TNF-alpha and IL-1beta plasmatic levels in the groups evaluated immediately after GTN treatment, suggesting possible GTN pathways. Celecoxib treatment showed no statistically significant difference in the NFkB levels during the different experimental periods.

NFkB is known to be one of the main inflammatory transcriptional regulators, which is strongly activated in cancer. Studies have not only demonstrated the critical role of NFkB in prostatic cancer progression regulation, from androgen dependent to androgen-independent cancer, but also the upregulation of the AR activity (Chen and Sawyers 2002; Jin, et al. 2008). The NFkB is kept activated, in the majority of the cases, by means of upstream signaling of the pro-inflammatory cytokines such as IL-1beta and TNF-alpha, or as a response to extracellular stimuli from the tumoral microenvironment (Karin, *et al.* 2002). In addition, NFkB could interact with other important transcription factors involved in the neoplastic process development such as STAT3 (Grivennikov and Karin 2010).

Also, studies showed TNF-alpha to be an important inflammatory mediator, acting in both lesion and tissue repair processes. When this cytokine is chronically produced, it acts as an endogenous promoter of tumoral growth, creating a favorable microenvironment for tumoral cell development and dissemination (Balkwill and Mantovani 2001). Other studies have shown the crucial role of TNF-alpha during the first step of carcinogenesis, acting both in cells predisposed to cancer development and in inflammatory cells in the stroma of different murine models (Balkwill 2006). Orlikova, *et al.* (2013) indicated the GTN beneficial effect on the TNFalpha pathways in leukemic cell lineage, while GTN treatment was able to decrease the TNF- alpha level, inhibiting NFkB activation, without showing toxicity to other healthy blood cells. Thus, the results pointed to GTN treatment effectiveness due to the decrease of the inflammatory process, particularly in the immediate response, in relation to TNF-alpha, IL-1beta, NFkB pathways.

Finally, the GTN chemoprevention effects, by means of significant pre-neoplastic and neoplastic lesion reduction and cancer progression delay, contributed to a prostatic microenvironment balance. The immediate molecular biological response to GTN and also Celecoxib treatments highlighted the inflammation as an important promoter and also intensifier process for prostatic cancer. In addition, Celecoxib showed itself to be efficient in the COX2 level regulation in the TRAMP mice model, even in advanced disease grade. Also, we concluded that the inflammatory process control in the first prostatic cancer grades was crucial for the downregulation of the signaling pathways involved in the proliferative processes in advanced cancer grade.

# 7. DECLARATION OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

## 8. FUNDING

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (2013/01294-8; 2013/23049-5).

# 9. FIGURES AND LEGENDS



Figure 1.

Figure 1. Photomicrographs depicting different lesions found in TRAMP ventral prostate. (A) Low-grade intraepithelial neoplasia (LGPIN); represented by epithelial cell stratification (\*). (B) High-grade intraepithelial neoplasia (HGPIN); epithelial stratification in papillary and cribriform pattern in the glandular lumen (†). (C) Well-differentiated adenocarcinoma; invasion of epithelial cells in the underlying layer of smooth muscle cells in the stroma (arrow); (D) Undifferentiated adenocarcinoma; tumoral development and lack of glandular cytoarchitecture (triangle). Ep: Epithelium; St: Stroma; L: Lumen. Hematoxylin-Eosin (a-d). (scale bar= A-D: 25µm; inset: 10µm).





Figure 2. Photomicrographs of the ventral prostate of TRAMP mice from T8 (A,B): Glandular acini with folded mucosa. Secretory epithelium with columnar cells and basal cells (Bc), and also LGPIN (\*) presence. Prostatic stroma with smooth muscle cells (Smc) interspersed with collagen fibers. T12 (C-E): Presence of LGPIN (\*), HGPIN (†) and invasion of epithelial cells in the stroma (well-differentiated adenocarcinoma) (arrow). Ventral lobe showing cells with nuclear atypia and pale and abundant cytoplasm (dotted arrow) T1GNT (f,g): Glandular acini with folded mucosa and scarce prostatic stroma. Decrease of epithelial proliferation foci. T1CEL (H-J): Proliferative lesions such as LGPIN (\*), HGPIN (†) and occasional points of well-differentiated adenocarcinoma (arrow). Atrophied secretory epithelium regions (a) and reduction of folded acinar mucosa. The stromal features were similar to the T1GTN group. Ep: epithelium; St: stroma; L: lumen. Hematoxylin-Eosin (A,C, F, H, J); Masson's Trichrome (B, D, E, G, I). (scale bar=25µm)





Figure 3. Photomicrographs of TRAMP mice ventral prostate from T22 cancer group (A-D): Hyperplasticglandular acini with different proliferative lesion grades such as HGPIN (†), welldifferentiated (arrow) and undifferentiated adenocarcinoma (triangle). Hyperplastic prostatic stroma with smooth muscle cells interspersed with collagen fibers and inflammatory cells. T2GNT (E-G): Simple secretory epithelium with cubic and columnar cells. Decrease of proliferative lesions and stromal fibrillar elements in relation to the cancer group and T2CEL. T2CEL (H-J): Folded acinar mucosa and proliferative lesions such as LGPIN (\*), HGPIN (†). Fibrocellular feature of prostatic stroma, highlighting abundant amount of collagen fibers (green). Ep: epithelium; St: stroma; L: lumen. Hematoxylin-Eosin (A, B, E, G, H, I); Masson's Trichrome (C, D, F, J). (scale bar= A-D,F,G,I,J: 25µm; E,H: 50µm).









T2CEL

Treated groups

T2GTN



Statistical Test: ANOVA Different lowercase letters indicate statistically significant difference \* p<0.05 Figure 4. Proliferative lesion incidence in TRAMP mice ventral prostate. Different lowercase letters indicate statistically significant differences among the groups. (one-way ANOVA : \* p<0.05).

Figure 5.



Figure 5. Goniothalamin and Celecoxib effects on the relative frequency of PCNA positive cells in different evaluation periods in TRAMP mice. (scale bar= $25\mu$ m) (one-way ANOVA : \*\*\*\* p<0.0001).



Figure 6. Goniothalamin and Celecoxib effects on relative frequency of apoptotic cells in different evaluation periods in TRAMP mice. (scale bar=25µm) (one-way ANOVA ).





Figure 7. Western blotting analysis of cyclooxygenase-2 (COX2), phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (pSTAT3), factor nuclear kappa B (NFkB), insulinlike growth factor receptor 1 (IGFR1) protein levels in the ventral prostate of the experimental groups. Different lowercase letters indicate statistically significant differences among the groups. (one-way ANOVA : \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001).



Figure 8. COX2, STAT3, IGFR1 immunoreactivities in the ventral prostate of TRAMP mice from T8 (A, E, I), T12 (B, F, J) T1GTN (C, G, K) and T1CEL (D, H, L). Epithelial and stromal reactivities were graded according to Table 1. (scale bar =25µm; insets 10µm).

# Figure 9.



Figure 9. COX2, STAT3, IGFR1 immunoreactivities in the ventral prostate of TRAMP mice from T22 (A, D, G,), T2GTN (B, E, H) and T2CEL (C, F, I). Epithelial and stromal reactivities were graded according to Table 2. (scale bar = $25\mu$ m; insets 10 $\mu$ m).

Figure 10.



Statistical Test: ANOVA and t-student Different lowercase letters indicate statistically significant difference \*\* p<0.01 \*\*\* p< 0.001

Figure 10. Goniothalamin effects on the TNF-alpha and IL1-beta (pg/ml) plasmatic concentrations in TRAMP mice. Different lowercase letters indicate statistically significant differences among the groups. (one-way ANOVA / t-student:; \*\* p<0.01; \*\*\*p<0.001).

### Supplementary Figure 1.



Supplementary Figure 1. Schematic representation of immediate and late responses to Goniothalamin and Celecoxib treatments. T1GTN: Immediate response to Goniothalamin treatment group; T2GTN: Late response to Goniothalamin treatment group; T1CEL: Immediate response to Celecoxib treatment group; T2CEL: Late response to Celecoxib treatment group.



Supplementary Figure 2.

Supplementary Figure 2. Representative images of the ventral prostate from TRAMP mice shown in 10X magnification. Hematoxylin-Eosin (A-H). (scale bar=100µm).



Supplementary Figure 3.

Supplementary Figure 3. Morphometric analysis of nuclear and cytoplasmatic areas in healthy and hyperplastic glandular epithelium. (one-way ANOVA: \*\*\* p<0.001).

# Supplementary Table 1.

Immediate Response Treatments											
	Т8		T12		T1GTN		T1CEL				
	Ер	St	Ер	St	Ер	St	Ер	St			
COX-2	3 Nu <sup>a</sup> /	1 Nu <sup>a</sup> /	3 Nu <sup>a</sup> /	2 Nu <sup>a</sup> /	2	1 Nuª /	1	1 Nu <sup>a</sup> /			
STAT-3	Cyt 3/2	Cyt 2/1	Cyt 3/2	Cyt 2/2	Nu <sup>a</sup> / Cyt 2/1	Cyt 2/2	Nu <sup>a</sup> / Cyt 2/2	Cyt 2/1			
IGFR-1	3	3	3	3	1	1	2	1			

Table 1. COX-2, STAT-3, IGFR-1 immunoreactivities in the ventral prostate of TRAMP mice in immediate response treatments.

Immunoreactivity distribution: 0 (0%), 1 (33%), 2 (33-66%), e 3 (66%). Ep: epithelium / St: Stroma; Nu: nucleus / Cyt: cytoplasm.

<sup>a</sup> :p-STAT-3

# Supplementary Table 2.

Table 2. COX2, STAT3, IGFR1 immunoreactivities in the ventral prostate of TRAMP mice in late response treatments.

Late Response Treatments											
	T	22	T20	GTN	T2CEL						
	Ер	St	Ер	St	Ер	St					
COX-2	3	3	3	2	2	2					
STAT-3	Nu <sup>a</sup> / Cyt										
••••••	3/2	3/2	1/2	1/1	1/2	2/1					
IGFR-1	1	3	1	2	1	2					

Immunoreactivity distribution: 0 (0%), 1 (33%), 2 (33–66%), e 3 (66%).

Ep: epithelium / St: Stroma; Nu: nucleus / Cyt: cytoplasm.

<sup>a</sup> :p-STAT-3
#### 10. REFERENCES

Al-Qubaisi M, Rozita R, Yeap SK, Omar AR & Ali AM 2011 Alitheen N.B. Selective cytotoxicity of goniothalamin against hepatoblastoma HepG2 cells. *Molecules* **6** 2944-2959.

Balkwill F 2006 TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **25** 409-416.

Balkwill F & Mantovani A 2001 Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357** 539-545.

Bishop JL, Thaper D & Zoubeidi A 2014 The Multifaceted Roles of STAT3 Signaling in the Progression of Prostate Cancer. *Cancers (Basel)* **6** 829-859.

Bissell MJ & Hines WC 2011 Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature Medicine* **17** 320-329.

Boehm T, Folkman J, Browder T & O'Reilly MS 1997 Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* **390** 404-407.

Chen CD & Sawyers CL 2002 NF-kappa B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer. *Molecular and Cellular Biology* **22** 2862-2870.

Cragg GM, Grothaus PG & Newman DJ 2009 Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. *Chemical Reviews* **109** 3012-3043.

Daniels NA, Chen YH & Bent S 2009 Antibiotic and anti-inflammatory use and the risk of prostate cancer. *BMC Research Notes* **2** 1-5.

de Fatima A, Kohn LK, Antonio MA, de Carvalho JE & Pilli RA 2005 (R)-Goniothalamin: total syntheses and cytotoxic activity against cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13** 2927-2933.

De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI & Nelson WG 1999 Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *American Journal of Pathology* **155** 1985-1992.

De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB & Nelson WG 2007 Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* **7** 256-269.

Djavan B, Eckersberger E, Espinosa G, Kramer G, Handisurya A, Lee C, Marberger M, Lepor H & Steiner GE 2009 Complex Mechanisms in Prostatic Inflammatory Response. *European Urology Supplements* **8**872-878.

Gingrich JR, Barrios RJ, Foster BA & Greenberg NM 1999 Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* **2** 70-75.

Gravitz L 2011 Chemoprevention: First line of defence. Nature 471 S5-7.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92** 3439-3443.

Grivennikov SI & Karin M 2010 Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **21** 11-19.

Hakeda Y, Harada S, Matsumoto T, Tezuka K, Higashino K, Kodama H, Hashimotogoto T, Ogata E & Kumegawa M 1991 Prostaglandin-F2-Alpha Stimulates Proliferation of Clonal Osteoblastic Mc3t3-E1 Cells by up-Regulation of Insulin-Like Growth Factor-I Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **266** 21044-21050.

Hamid AR, Umbas R & Mochtar CA 2011 Recent role of inflammation in prostate diseases: chemoprevention development opportunity. *Acta Medica Indonesiana* **43** 59-65.

Hanada T & Yoshimura A 2002 Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Reviews* **13** 413-421.

Huss WJ, Barrios RJ, Foster BA & Greenberg NM 2003 Differential expression of specific FGF ligand and receptor isoforms during angiogenesis associated with prostate cancer progression. *The Prostate* **54** 8-16.

Inayat-Hussain SH, Annuar BO, Din LB, Ali AM & Ross D 2003 Loss of mitochondrial transmembrane potential and caspase-9 activation during apoptosis induced by the novel styryl-lactone goniothalamin in HL-60 leukemia cells. *Toxicology in Vitro* **17** 433-439.

Jendrossek V 2013 Targeting apoptosis pathways by Celecoxib in cancer. Cancer Letters **332** 313-324.

Jin RJ, Lho Y, Connelly L, Wang Y, Yu X, Saint Jean L, Case TC, Ellwood-Yen K, Sawyers CL, Bhowmick NA, *et al.* 2008 The nuclear factor-kappaB pathway controls the progression of prostate cancer to androgen-independent growth. *Cancer Research* **68** 6762-6769.

Junqueira LC, Bignolas G & Brentani RR 1979 Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochemical Journal* **11** 447-455.

Kaplan PJ, Mohan S, Cohen P, Foster BA & Greenberg NM 1999 The insulin-like growth factor axis and prostate cancer: Lessons from the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model. *Cancer Research* **59** 2203-2209.

Karin M, Cao Y, Greten FR & Li ZW 2002 NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Reviews Cancer* **2** 301-310.

Kido LA, Hetzl AC, Candido EM, Montico F, Lorencini RM & Cagnon VH 2014 Antiangiogenic and finasteride therapies: responses of the prostate microenvironment in elderly mice. *Life Sciences* **106** 58-70.

Kirschenbaum A, Liu XH, Yao S & Levine AC 2001 The role of cyclooxygenase-2 in prostate cancer. *Urology* **58** 127-131.

Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, Subbaramaiah K & Dannenberg AJ 2001 Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clinical Cancer Research* **7** 429-434.

Levy DE & Lee CK 2002 What does Stat3 do? *Journal of Clinical Investigation* **109**1143-1148. Liu XH & Rose DP 1996 Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Research* **56** 5125-5127.

Mahmud SM, Tanguay S, Begin LR, Franco EL & Aprikian AG 2006 Non-steroidal antiinflammatory drug use and prostate cancer in a high-risk population. *European Journal of Cancer Prevention* **15** 158-164.

Montico F, Hetzl AC, Candido EM, Favaro WJ & Cagnon VH 2011 Hormonal therapy in the senescence: Prostatic microenvironment structure and adhesion molecules. *Micron* **42** 642-655.

Montico F, Kido LA, Hetzl AC & Cagnon VH 2015 Prostatic angiogenic responses in late life: antiangiogenic therapy influences and relation with the glandular microenvironment in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model. *The Prostate* **75** 484-499.

Montico F, Kido LA, Hetzl AC, Lorencini RM, Candido EM & Cagnon VHA 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. *Histochemistry and Cell Biology* **142** 269-284.

Narayanan BA, Narayanan NK, Pttman B & Reddy BS 2006 Adenocarcina of the mouse prostate growth inhibition by celecoxib: Downregulation of transcription factors involved in COX-2 inhibition. *The Prostate***66** 257-265.

Nelson WG, De Marzo AM & Isaacs WB 2003 Prostatecancer. *New England Journal of Medicine* **349** 366-381.

Orlikova B, Schumacher M, Juncker T, Yan CC, Inayat-Hussain SH, Hajjouli S, Cerella C, Dicato M & Diederich M 2013 Styryl-lactone goniothalamin inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation. *Food and Chemical Toxicology* **59** 572-578.

Rodriguez LAG & Gonzalez-Perez A 2004 Inverse association between nonsteroidal antiinflammatory drugs and prostate cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers* & *Prevention* **13** 649-653.

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. *Endocrine-Related Cancer* **11** 225-254.

Sam TW, Sew-Yeu C, Matsjeh S, Gan EK, Razak D, Mohamed AL 1987 Goniothalamin oxide: An embryotoxic compound from Goniothalamus macrophyllus (Annonaceae). *Tetrahedron Letters* **28** 2541-2544.

Sansone P & Bromberg J 2012 Targeting the Interleukin-6/Jak/Stat Pathway in Human Malignancies. *Journal of Clinical Oncology* **30** 1005-1014.

Siegel RL, Miller KD & Jemal A 2015 Cancer statistics, 2015. *Cancer Journal for Clinicians* **65** 5-29.

Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L & Diederich M 2010 The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *International Journal of Cell Biology* **2010** 215158.

Sozer S, Diniz G & Lermioglu F 2011 Effects of celecoxib in young rats: histopathological changes in tissues and alterations of oxidative stress/antioxidant defense system. *Archives of Pharmacal Research* **34**253-259.

Thapa D & Ghosh R 2015 Chronic inflammatory mediators enhance prostate cancer development and progression. *Biochemical Pharmacology* **94** 53-62.

Tomas D & Kruslin B 2004 The potential value of (Myo)fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. *The Prostate* **61** 324-331.

Tsujii M, Kawano S & DuBois RN 1997 Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94** 3336-3340.

Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD & Rowley DR 2002a Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clinical Cancer Research* **8** 2912-2923.

Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Dang TD, Ayala GE & Rowley DR 2002b Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer Research* **62** 3298-3307.

Vendramini-Costa DB & Carvalho JE 2012 Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Current PharmaceuticalDesign* **18** 3831-3852.

Vendramini-Costa DB, de Castro IB, Ruiz AL, Marquissolo C, Pilli RA & de Carvalho JE 2010 Effect of goniothalamin on the development of Ehrlich solid tumor in mice. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **18**6742-6747.

Vendramini-Costa DB, Monteiro KM, Iwamoto LH, Jorge MP, Tinti SV, Pilli RA & de Carvalho JE 2014 Gastroprotective effects of goniothalamin against ethanol and indomethacin-induced gastric lesions in rats: Role of prostaglandins, nitric oxide and sulfhydryl compounds. *Chemico-Biological Interactions* **224C** 206-212.

Vendramini-Costa DB, Spindola HM, de Mello GC, Antunes E, Pilli RA & de Carvalho JE 2015 Anti-inflammatory and antinociceptive effects of racemic goniothalamin, a styryl lactone. *Life Sciences* **15** :83-90

Weibel ER 1963 Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory Investigation* **12** 131-155.

Wu J & Yu E 2014 Insulin-like growth factor receptor-1 (IGF-IR) as a target for prostate cancer therapy. *Cancer and Metastasis Reviews* **33** 607-617.

Yang J, Chatterjee-Kishore M, Staugaitis SM, Nguyen H, Schlessinger K, Levy DE & Stark GR 2005 Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Research* **65** 939-947.

Yatkin E, Bernoulli J, Talvitie EM & Santti R 2009 Inflammation and epithelial alterations in rat prostate: impact of the androgen to oestrogen ratio. *International Journal of Andrology* Zar JH 1999 *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall Upper. **32** 399-410.

# 5. ARTIGO CIENTÍFICO II.

# Publicado no periódico "The Prostate" 2017 77(8):838-848. doi: 10.1002/pros.23324.

# 1. TITLE

Goniothalamin and Celecoxib effects during aging: targeting pro-inflammatory mediators in chemoprevention of prostatic disorders.

Larissa Akemi Kido<sup>1</sup>, Fabio Montico<sup>1</sup>, Débora Barbosa Vendramini-Costa<sup>2</sup>, Ronaldo Aloise Pilli<sup>3</sup>, Valeria Helena Alves Cagnon<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup> The Wistar Institute, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America.

<sup>3</sup> Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

Key-words: Prostate; Aging; Inflammation; Goniothalamin; Celecoxib

### 2. ABSTRACT

### Background

Prostate is highly affected by aging, which lead to inflammatory disorders that can predispose to cancer development. Chemoprevention has emerged as a new therapeutic approach, intensifying studies evaluating the biological properties of new compounds. The aim of this study was to characterize the inflammatory responses in the prostate ventral lobe from senile mice treated with Goniothalamin (GTN), a promising natural compound with anti-inflammatory and antiproliferative properties. Its activity was compared to Celecoxib, an established nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID).

### Methods

The animals were divided into: Control groups; Young (18 week-old FVB), Senile (52 weekold FVB). Treated groups: Senile-Goniothalamin (150mg/Kg orally), Senile-Celecoxib (10mg/Kg orally). The ventral lobe was collected after 4 weeks for light microscopy, immunohistochemistry, ELISA and western blotting analysis

## Results

Both treatments were efficient in controlling the inflammatory process in the prostate from senile mice, maintaining the glandular morphology integrity. GTN reduced all inflammatory mediators evaluated (TNF-α, COX-2, iNOS) and different from Celecoxib, it also decreased the protein levels of NF-kB and p-NF-kB.

#### Conclusions

GTN and Celecoxib controlled inflammation in the prostate, and sensitized the senescent microenvironment to anti-inflammatory stimuli. Thus, both treatments are indicated as potential drugs in the prostatic disease prevention during senescence.

### **3. INTRODUCTION**

Aging is associated to significant changes in the organism, being an important factor for the development of urological disorders, including morphological and functional alterations in the prostate (1-4). It is known that during the aging period occurs a progressive decline of testosterone and dehydroepiandrosterone (DHEA) circulating levels in men, which is accompanied by increase in androgen conversion to estrogen, resulting in hormonal imbalance (4,5). In addition, high estrogen levels associated with low testosterone levels have been linked to prostatic inflammation and emergence of premalignant lesions upon aging (6)

The prostate has intense immune activity involving broad signals of defense against non-self-antigens, and shows immune cells scattered in the epithelium and stroma, such as T and B-lymphocytes, macrophages and mast cells (7,8). When chronically stimulated, epithelial, stromal and immune cells presented in the prostate secrete high levels of proinflammatory cytokines (9,10). These cytokines induce smooth muscle cells growth, as well as epithelium and stroma proliferation through autocrine and paracrine mechanisms, or via induction of COX-2 expression (10-13).

Chronic inflammation also leads to the production of free radicals derived from oxidative stress, such as nitric oxide synthase (iNOS), reactive nitrogen species (RNS) and many reactive oxygen species. The relationship between oxidative stress and antioxidant components in cells plays an essential role in the development of prostatic diseases, and several studies has pointed to the aging process as a key factor in the initiation of these events (10,14). Sciarra, et al. (15) characterized the iNOS imunoexpression in human prostate, founding a gradual increase in the expression of iNOS in human benign prostatic hyperplasia (BPH), high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostate cancer (PCa), when compared to healthy samples.

Oxidative stress, as well as inflammatory and genotoxic processes are strong stimulators of NF-κB transcription factor family (16). Due to the wide NF-κB responsiveness to different stimuli, this transcription factor is a key mediator in the regulation of different pathways related to aging, such as immune response, metabolism, cell senescence and apoptosis (16).

Wong, et al. (17) found that prostatic epithelial cells exposed to a conditioned media with soluble pro-inflammatory mediators were able to activate NF- $\kappa$ B, which led to local production of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, and simultaneously estrogen receptor alpha (ER- $\alpha$ ) and VCAM-1 adhesion molecule upregulation. Also, NF- $\kappa$ B dysregulation can lead to inflammatory response amplification, mainly in the tumor microenvironment (10). Thus, chronic inflammation in the prostate environment may be a risk factor for the development of prostate cancer (17). According to Sfanos and De Marzo (18), the origin of the inflammatory stimuli in prostate is not fully defined, and the understanding of prostate immunobiology is still insufficient, especially with regard to aging process.

Literature shows that nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been extensively evaluated in different experimental models, focusing in chemoprevention and treatment of different cancer types (19,20). Celecoxib, the NSAID used in the present study, is a potent anti-inflammatory cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor. COX-2 participates in the immune response, and acts catalyzing the prostaglandins biosynthesis from arachidonic acid (20). According to Sfanos and De Marzo (18), COX-2 overexpression in prostate was correlated to proliferative inflammatory atrophy (PIA) lesion, which is a risk factor predictable for tumor development. Although the number of available anti-inflammatory drugs is high, many of them can lead to side effects after long-term treatments (21). Therefore, the search for new anti-inflammatory drugs is crucial for chemopreventive treaments, and nature has been certainly an important source of these new compounds (21). The styryl lactone Goniothalamin (GTN) is a secondary metabolite found in plants from *Goniothalamus* genus (22,23). It was first isolated in 1972 and after that, several studies have characterized different GTN properties, such as anti-proliferative and cytotoxic against cancer cells, anti-inflammatory, pro-apoptotic and gastroprotective (22,24-28).

The pharmacological features of GTN have motivated the emergence of new studies focused on its synthesis and production of others analogues (29). According to Kido et al. (30) the GTN racemic form reduced the incidence of preneoplastic lesions and retard tumor progression in prostate gland of transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP).

Also, the same authors observed that GTN was effective in inflammatory control, a fact that certainly contributed to maintaining the glandular morphology of the prostate, as well as in the prevention of cancer (30).

Considering the anti-inflammatory potential of GTN, this study aimed to characterize the prostate microenvironment from senile mice submitted to GTN therapy, focusing on morphological and inflammatory parameters, considering the importance of glandular inflammation during aging. Celecoxib was used as a control, due to well-known antiinflammatory properties already described in the literature.

## 4. MATERIALS AND METHOD

## Animals and Drugs

A total of 60 male FVB mice were used and divided into four experimental groups. The young (YNG/ 18 weeks old/ n=20) and the senile (SEN/ 52 weeks old/ n=20) control groups received carboxymethyl cellulose (CMC) 0.05% or phosphate-buffered saline (PBS) + 1% Tween 80 (10mL/Kg) vehicles. The senile Goniothalamin group (SNGTN/52 weeks old/ n=10) received 150mg/Kg of Goniothalamin orally (28), three times a week during 30 days. The senile Celecoxib group (SNCEL /52 weeks old/ n=10) was treated orally with 10mg/Kg of Celecoxib (31), five times a week for 30 days. All mice were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation on Laboratory Animal Science (CEMIB) at the University of Campinas (UNICAMP) and received water and solid diet *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brazil). This study was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (University of Campinas – UNICAMP, protocol n°3119-1).

Goniothalamin preparation followed a published procedure (32) and it was emulsified with 1% Tween 80 (Synth, Diadema, SP, Brazil) and dissolved in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.0 (28). Celecoxib (CELEBRA/Pfizer Pharmaceuticals LLC, Caguas, Puerto Rico), was diluted in CMC 0.05% (31).

## Morphological analysis

Prostate ventral samples from five animals/group were collected and fixed by immersion in Bouin's solution during 24 h. After that, the samples were dehydratated, diaphanized and embedded in plastic polymers (Paraplast®, Sigma Aldrich,St Louis, MO,USA). The material was cut into 5 µm thick the Hyrax M60 microtome (Zeiss, Munich, Germany) and then stained with hematoxylin–eosin and Masson's Trichrome (33). The slides were photographed with a Nikon Eclipse E-400 photomicroscope (Nikon, Tokyo, Japan).

### Immunohistochemistry

Prostate ventral lobe samples were collected from five animals in each group, the same used for morphological analyses. The antigens were detected using the following antibodies: mouse monoclonal COX-2 (sc-376861 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, United States of America), rabbit polyclonal IL-17 (sc-792 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, United States of America), and rabbit monoclonal iNOS (ab136918- Abcam, Cambridge, MA, USA). The immunohistochemistry protocol was based on Montico, et al. (34), and all the primary antibodies were diluted in a 1:50 proportion. Then, the slides were incubated for 2 hours with HRP-conjugated secondary antibodies, goat anti-mouse IgG (W4021, Promega Corporation, Madison, WI, EUA) or goat anti-rabbit IgG (W4018, Promega Corporation, Madison,WI, EUA). The peroxidase activity was detected with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) precipitate, and Harris' hematoxylin was used for counterstaining. The positive antibody reaction was determined by brown-stained DAB precipitate, and based on the observation of 10 random and non-overlapping microscopic fields under 400X magnification per animal, the immunoreactivity frequency was graded on a 0-3 scale, according to the percentage of positive areas for each antigen: 0 (absent) = 0%; 1 (weak) = 1-33%; 2 (moderate) = 34-66%; and 3 (intense) = more than 66%. (35-37). For all immunohistochemical analyses a negative control were used, consisting of no primary antibody.

## Western Blotting

Prostate ventral lobe samples from five animals/group were homogenized with RIPA extraction buffer (Millipore, Temecula, CA, USA) and protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA), using a Polytron homogenizer (Kinematica Inc., Lucerne, Switzerland). The extracts were centrifuged at 14000 rpm for 15 min at 4 °C and the protein level was quantified with Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Aliquots containing 35µg protein were separated by electrophoresis in a SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions. Subsequently, the proteins were electrically transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL, USA). The membranes were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) for 1h and incubated overnight at 4 °C with mouse monoclonal NF-KB p65 (ab13594 - Abcam, Cambridge, MA, USA), rabbit monoclonal phosphorylated-NF-kB p65 (#3033- Cell Signaling Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit monoclonal iNOS (ab136918 -- Abcam, Cambridge, MA, USA), mouse monoclonal TNF- $\alpha$  (ab8348-Abcam, Cambridge, MA, USA) in the dilution range of 1:350–500. After that, the membranes were incubated for 2h with secondary HRP conjugate anti-rabbit and anti-mouse antibodies in a dilution range of 1:4000-1:6000 in 1% BSA. To detect reactive bands, membranes were exposed to chemiluminescence solution (SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate / Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) for 5 min and captured using Gene Gnome equipment and the GeneSys image acquisition software (Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK). The mouse monoclonal  $\beta$ -actin antibody (sc-81178, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was used as endogenous control. The intensity of antigen bands was quantified 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.

## ELISA

Blood samples were centrifuged (Sigma® 3-18K refrigerated centrifuge) at 3000 rpm for 10 minutes. The plasma obtained was used to determine IL-1β (KMC0012) concentration

using commercial reagents for the enzyme immunoassay (Novex®, Life Technologies Corporation, Grand Island, NE, USA). Sample absorbance was read using Multi-Mode Microplate Reader Model Synergy H1M equipment (Bio-Tek Instruments, Inc., Winoosk, VT, USA) at a 450 nm wave length.

## **Statistical analysis**

The statistical analysis for protein levels among the experimental groups was carried out by t-student test or variance analysis (ANOVA) followed by Tukey's multiple range test, with the level of significance set at 5 % (38). The results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation.

## 5. RESULTS

## Light Microscopy

## Young Group (YNG)

The prostatic ventral lobe predominantly presented columnar cells with basal nuclei and folded mucosa (Figures 1a-c). Basal cells were discontinuously intermingled with luminal cells on the basement membrane (Figures 1a-c). The prostatic stroma showed fibrocellular formation with smooth muscle cells and collagen fibers organized concentrically around the prostatic acini and blood capillaries (Figures 1a-c).

## Senile Group

The main feature of the senile mice prostate was the widespread epithelial atrophy and decreased folded mucosa (Figures 1d-f). Intraepithelial neoplasia (PIN), with different architectural patterns was observed, characterized by secretory cell stratification. Also, basement membrane disruption led to epithelial cell invasion in the prostatic stroma, characterizing well-differentiated prostatic adenocarcinoma (Figure 1e). The prostatic stroma presented significant changes, such as hypertrophy and hyperplasia, represented by smooth muscle cell layer thickening, intermingled with fibrillar elements, which also showed an

increase (Figures 1e-f). Furthermore, inflammatory cell foci were frequent in the stromal compartment, especially lymphocytes, which were predominantly identified in the periacinar area (Figures 1d,f).

## Goniothalamin Group (SNGTN)

After GTN treatment, the majority of the glandular acini showed folded mucosa and simple epithelium and columnar cells, with occasional atrophied areas (Figures 1g-i). However, alterations such as occasional PIN foci were still observed (Figure 1i). The prostatic stroma showed similar features to those found in the YNG group, highlighting the apparent reduction on inflammatory infiltrate focus. There was a significant structural recovery of epithelial and stromal compartments, when compared to untreated senile animals (Figures 1d-i).

## Celecoxib Group (SNCEL)

The secretory epithelium ranged from columnar to cubic form, similar to mice treated with GTN (Figures j-I). Also, occasional PIN lesions were found in this group, which were also characterized by cellular proliferation showing cell stratification (Figure 1k). In general, the prostatic stroma displayed normal morphology, despite having fibromuscular hypertrophy in some areas. Also, the inflammatory infiltrate foci decreased apparently with the Celecoxib treatment (Figure 1I).

## Immunohistochemistry and Western Blotting analyses

## COX-2

COX-2 positive immunolabeling was identified in prostatic epithelium and stroma from different experimental groups, particularly in the SEN group, which showed intense reactivity in both prostatic compartments. The GTN treatment led to a slight reduction in COX-2 positivity in the epithelium, and the stromal immunoreactivity was similar to the senile group (Figures 2 a-d; Table 1). The Celecoxib treatment led to the reduction of COX-2 immunolocalization frequency in both prostatic compartments.

In general, the Western Blotting analysis corroborated the immunohistochemistry results. The senile group showed increased levels of COX-2 compared to the young group, highlighting the prostatic inflammatory microenvironment during senescence. GTN and Celecoxib treatments led to a significant reduction of COX-2 levels (Figure 3a).

## IL-17

Intense epithelial staining and weak stromal staining for IL-17 were verified in the SEN group. After treatments with GTN and Celecoxib, the IL-17 immunoreactivity decreased in the prostate when compared to the SEN group, being discontinuously expressed in the apical region of the epithelial cells (Figures 2e-h; Table 1).

## iNOS

The SEN group presented intense iNOS reactivity, especially in the prostatic epithelium. In contrast, GTN treatment resulted in iNOS decrease, which was moderate in the epithelium and weak in the stroma. The Celecoxib treatment also led to a decrease on iNOS expression in both prostatic compartments (Figure 2i-I; Table 1). The results from Western Blotting analysis followed the same pattern of the immunohistochemistry, showing a significant decrease after both treatments (Figure 3b).

#### NF- $\kappa$ B, p-NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$

The NF- $\kappa$ B, p-NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  immunoexpression increased significantly in the senile animals, compare to young animals. Nevertheless, the pro-inflammatory profile in the senile mice prostate was modified by both experimental treatments (Figure 3c-e). GNT treatment reduced the NF- $\kappa$ B, p-NF- $\kappa$ B, and TNF- $\alpha$  immunoexpression in the senile prostate. On the other hand, Celecoxib reduced TNF- $\alpha$  expression but did not affect NF- $\kappa$ B and p-NF- $\kappa$ B expression (Figure 3c, e).

#### ELISA

Elevated IL-1 $\beta$  levels were verified by the immunoenzymatic analysis during the aging, when compared to the young group. However, none of the treatments was able to decrease the systemic levels of this pro-inflammatory cytokine.

## 6. DISCUSSION

Previous studies by our research group have demonstrated that the inflammatory process related to aging triggers and worsens prostatic lesions, by promoting morphological and molecular changes in the prostate (30,39,40). Thus, focusing on the prevention of the prostatic lesion in senile animals, this study proposed two experimental approaches: Goniothalamin (GTN) administration, a natural compound with anti-inflammatory and antiproliferative properties and evaluated for the first time in senile animals; and Celecoxib administration, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) widely evaluated in the chemoprevention and cancers treatments. The present results demonstrate efficacy of both treatments through the inflammatory process control in the senile prostate, as well as glandular morphology maintenance. However, GTN treatment differs from Celecoxib due to its ability to downregulate NF-κB pathway.

The aging process is accompanied by upregulation of proinflammatory cytokines, resulting in increased susceptibility to infections, autoimmune diseases, and cancer in this life period (41). According to Chung, et al. (42), chronic inflammation related to age can be summarized into two main processes: 1) frequent disruption of immune system; 2) change of the redox state during senescence. These authors pointed out that both processes lead to increased systemic inflammation due to activation of a variety of inflammatory mediators, and continuous increase in redox imbalance induced by oxidative stress. At the same time, the prostate inflammation is related to several factors, such as injuries, age, hormonal imbalance, diet, exposure to environmental contaminants, among other factors (8). The hormone imbalance is a key point in the link aging - inflammation and this interaction between inflammatory process and sexual hormones and their receptors facilitates PCa development

(43,44). Over the past few years our research group has confirmed the prostate microenvironment vulnerability, considering the inflammatory events, through studies of castration, hormonal dysregulation in senile models and occurrence of neoplastic processes, emphasizing the need to search for therapies focused in immune system modulation (39,40)

In the present results, the anti-inflammatory effects of GTN and Celecoxib has led to morphological recovery of ventral prostate, characterized by reduction of epithelial atrophy and inflammatory infiltration in the prostate of senile mice. Furthermore, the treatments have been able to promote a stromal restructuring. It is known that during aging processes the prostate undergoes involution due to decrease in testosterone levels (39,40,45). The aging process results in typical epithelial atrophy and lack of enfolding glandular mucosa, simultaneously to stromal compartment changes, which is characterized by smooth muscle cells hyperthophy and hyperplasia, increase of fibrillar elements and inflammatory cells (39,40,45). Moreover, the altered microenvironment due to infectious factor presence, injuries, or under influence of inflammatory stimuli, reacts leading to eradication of harmful processes through epithelial cells regeneration, stromal remodeling and vascular permeability increase (46,47). In chronic inflammation, this same process of natural tissue repair can result in irreversible damage, culminating in neoplastic processes (46,47).

Our results indicate that GTN treatment, under the experimental conditions evaluated, was more efficient than Celecoxib in controlling the inflammatory process, considering the inhibitory effect on the NF- $\kappa$ B activation. It is well known that NF- $\kappa$ B is a major transcriptional regulator of inflammation, which has its activity regulated by intracellular signal transduction events, in response to stimuli such as oxidative processes, tissue injury, genomic instability and aging (10,16,48). Among the several NF- $\kappa$ B activators, .+TNF- $\alpha$  and IL-1- $\beta$  have been linked to the support of the inflammatory condition in the prostate via NF- $\kappa$ B, as well as the maintenance of injuries as proliferative inflammatory atrophy (PIA), HBP and CaP (49-51). Recently, our research group showed that treatment with GTN in the transgenic model for prostate adenocarcinoma (TRAMP) resulted in a significant decrease on NF- $\kappa$ B levels in the ventral prostate, as well as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  plasma levels (30). The same authors suggested

a possible mechanism of GTN action, however, based only on the results of their study itself, since there is no literature data about GTN action in the prostate. Previously, Orlikova, et al. (26) reported GTN beneficial effects through NF- $\kappa$ B activation inhibition induced by TNF- $\alpha$  in leukemic cells, without other blood cells toxicity. Furthermore, the evaluation of kavaina, styryl lactone analogous to the natural GTN form, also indicated the inhibitory capacity in TNF- $\alpha$ -induced Nf $\kappa$ B activation, and its translocation to the nucleus (52). In the present results it is remarkable that although Celecoxib has significantly reduced TNF- $\alpha$  protein levels, the reduction caused by GTN treatment was even more expressive.

Vykhovanets et al. (51) showed that IL1-β systemic administration has led to extravasation of mononuclear cells in prostatic stroma of C57BL/6J mice, culminating in NF- $\kappa$ B p65 increase and also in cytokines upregulation, such as IL -17. These same authors also tested a NF- $\kappa$ B inhibitor, dexamethasone, hours before of IL-1β administration to elucidate the NF- $\kappa$ B activation mechanisms, verifying significant reduction in most of the inflammatory markers in prostate tissue, such as IL-17 (51). The results herein showed increased IL-1β systemic levels in senile animals in relation to young group, what could be linked to the intense inflammatory response in prostate microenvironment during this life period and with the activation of NF- $\kappa$ B. GTN treatments decreased NF- $\kappa$ B levels, which could be a consequence of the inhibitory effect on TNF- $\alpha$  expression. Decrease in NF- $\kappa$ B levels is translated into an inhibitory effect on the expression of a wide broad of cytokines, including IL-17 (51). In fact, IL-17 immunoreactivity was reduced in the prostate of animals treated with GTN. Decrease of IL-17A levels due to GTN treatment was also observed by Vendramini-Costa et al. (2016) in colitis-induced and spontaneous colorectal cancer models (53)

Other studies have shown that the wide transcriptional NF-κB activity acts on the COX-2 and iNOS upregulation, specifically in two binding sites in the promoter region in COX-2 gene, and in the TATA box and consensus sequence in the promoter region that encodes iNOS (54-56). Both molecules are upregulated during the inflammatory process and under specific physiological conditions, the enzymatic activity of COX-2 and iNOS products can act cooperatively (10,57). Thus, since NF-κB can activate iNOS and COX-2 genes, the same pathophysiological stimuli can simultaneously activate both mediators. Moreover, the NO production by iNOS expression, induced by NF-κB or not, can also affect COX-2 expression and its catalytic activity (57). The treatment with GTN led to decrease in iNOS and COX-2 levels, what could be linked to the decrease in NF-κB levels. Recently was shown that treatments with GTN decreases the iNOS expression in primary macrophages stimulated with LPS and in animals developing chemical-induced colitis (53), highlighting the anti-inflammatory and possible, antioxidant effects of GTN. Therefore, based on the results presented and those reported in the literature, it is possible to suggest that GTN anti-inflammatory action in senile mice prostate was primarily due to the modulatory action of this compound in NF-κB activation, possibly induced via TNF- $\alpha$ , and as consequence decreasing the levels of other mediators.

As expected, Celecoxib treatments reduced COX-2 levels in senile prostate. In addition, this treatment also reduced TNF- $\alpha$  and iNOS levels, but without affecting NF- $\kappa$ B and p-NF- $\kappa$ B expression. This is in agreement with previous reports that highlights Celecoxib as a CaP chemopreventive agent, delaying the preneoplastic lesions incidence, tumor progression, and reducing levels of different pro-inflammatory mediators besides COX-2 (58-60). According to Narayanan, et al. (50), the administration of 500mg/kg of Celecoxib led to decreased iNOS and NF- $\kappa$ B p65 activities in macrophages from rat prostate, characterizing these proteins as primary mediators of early carcinogenesis stages. It is important to say that Celecoxib dose used in the study herein was fifty times lower than that used by Narayanan, et al. (50), and although we have no statistically significant changes in NF- $\kappa$ B levels, the experimental methodology presented in this study was positive for prostate morphofunctional recovery during the aging.

Studies have shown that Celecoxib anti-inflammatory effects could occur regardless of COX-2 blocking (42,61). Tago-Funakoshi et al. (62) verified that Celecoxib was able to inhibit the NFkB nuclear translocation induced by TNF- $\alpha$ , and decrease proinflammatory cytokines expression, which are targets in this pathway. However, similarly to the observed in this study, in a recent study published by our group we found that Celecoxib was not able to reduce NF-

 $\kappa$ B levels in the TRAMP prostate, despite having significantly reduced COX-2 levels (30). In addition, our results indicated the same tendency found in the TRAMP model (30), highlighting the potential of the prostate of senile mice to develop pro-tumorigenic features, and the susceptibility of this microenvironment to create a molecular imbalance and loss of epithelialstromal interaction. Accordingly, the results herein suggest that Celecoxib may have acted independently of COX-2 blockade, altering the prostate response through iNOS and TNF- $\alpha$ downregulation. Thus, Celecoxib minimized the pro-inflammatory profile in the prostate of senile mice, restoring the glandular balance.

Finally, GTN and Celecoxib controlled inflammation in the prostate and were able to sensitize the senescent microenvironment for anti-inflammatory stimuli. GTN affected the NFκB pathway, reducing the levels of this transcription factor and of other mediators related to this pathway. In sum, both treatments are indicated as potential drugs to be used in the prevention of prostatic disease during senescence, but GTN arises as a promising alternative to standard anti-inflammatory drugs. Moreover, we emphasize the relevance of chemopreventive therapies during the aging process to protect the senile prostate from inflammatory disorders and cancer development.

### 7. FUNDING

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (2013/01294-8; 2013/23049-5).

### 8. REFERENCES

 Banerjee S, Banerjee PP, Brown TR. Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. Endocrinology 2000;141(2):821-832.

2. Krtolica A, Campisi J. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. Int J Biochem Cell Biol 2002;34(11):1401-1414.

3. Lau KM, Tam NN, Thompson C, Cheng RY, Leung YK, Ho SM. Age-associated changes in histology and gene-expression profile in the rat ventral prostate. Lab Invest 2003;83(5):743-757.

4. Morales A. Androgen replacement therapy and prostate safety. Eur Urol 2002;41(2):113-120.

5. Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR, Baltimore Longitudinal Study of A. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. J Clin Endocrinol Metab 2001;86(2):724-731.

6. Ellem SJ, Wang H, Poutanen M, Risbridger GP. Increased endogenous estrogen synthesis leads to the sequential induction of prostatic inflammation (prostatitis) and prostatic pre-malignancy. Am J Pathol 2009;175(3):1187-1199.

7. Bostwick DG, de la Roza G, Dundore P, Corica FA, Iczkowski KA. Intraepithelial and stromal lymphocytes in the normal human prostate. Prostate 2003;55(3):187-193.

8. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. Inflammation in prostate carcinogenesis. Nat Rev Cancer 2007;7(4):256-269.

9. Begley LA, Kasina S, MacDonald J, Macoska JA. The inflammatory microenvironment of the aging prostate facilitates cellular proliferation and hypertrophy. Cytokine 2008;43(2):194-199.

10. Hamid AR, Umbas R, Mochtar CA. Recent role of inflammation in prostate diseases: chemoprevention development opportunity. Acta Med Indones 2011;43(1):59-65.

11. Konig JE, Senge T, Allhoff EP, Konig W. Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. Prostate 2004;58(2):121-129.

12. Wang W, Bergh A, Damber JE. Chronic inflammation in benign prostate hyperplasia is associated with focal upregulation of cyclooxygenase-2, Bcl-2, and cell proliferation in the glandular epithelium. Prostate 2004;61(1):60-72.

13. Nickel JC. Inflammation and benign prostatic hyperplasia. Urol Clin North Am 2008;35(1):109-115; vii.

14. Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul HK. Oxidative stress in prostate cancer. Cancer Lett 2009;282(2):125-136.

15. Sciarra A, Mariotti G, Salciccia S, Autran Gomez A, Monti S, Toscano V, Di Silverio F. Prostate growth and inflammation. J Steroid Biochem Mol Biol 2008;108(3-5):254-260.

16. Tilstra JS, Clauson CL, Niedernhofer LJ, Robbins PD. NF-kappaB in Aging and Disease. Aging Dis 2011;2(6):449-465.

17. Wong CP, Bray TM, Ho E. Induction of proinflammatory response in prostate cancer epithelial cells by activated macrophages. Cancer Lett 2009;276(1):38-46.

18. Sfanos KS, De Marzo AM. Prostate cancer and inflammation: the evidence. Histopathology 2012;60(1):199-215.

19. Kismet K, Akay MT, Abbasoglu O, Ercan A. Celecoxib: a potent cyclooxygenase-2 inhibitor in cancer prevention. Cancer Detect Prev 2004;28(2):127-142.

20. Jendrossek V. Targeting apoptosis pathways by Celecoxib in cancer. Cancer Lett 2013;332(2):313-324.

21. Vendramini-Costa DB, Spindola HM, de Mello GC, Antunes E, Pilli RA, de Carvalho JE. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of racemic goniothalamin, a styryl lactone. Life Sci 2015;139:83-90.

22. Jewers K, Davis JB, Dougan J, Manchanda AH, Blunden G, Kyi A, Wetchapinan S. Goniothalamin and its distribution in four Goniothalamus species. Phytochemistry 1972;11(6):2025-2030.

23. Sam TW, Sew-Yeu C, Matsjeh S, Gan EK, Razak D, Mohamedb AL. Goniothalamin oxide: An embryotoxic compound from Goniothalamus macrophyllus (annonaceae). Tetrahedron Letters 1987;28(22):2541-2544.

24. Inayat-Hussain SH, Osman AB, Din LB, Ali AM, Snowden RT, MacFarlane M, Cain K. Caspases-3 and -7 are activated in goniothalamin-induced apoptosis in human Jurkat T-cells. FEBS Lett 1999;456(3):379-383.

25. Al-Qubaisi M, Rozita R, Yeap SK, Omar AR, Ali AM, Alitheen NB. Selective cytotoxicity of goniothalamin against hepatoblastoma HepG2 cells. Molecules 2011;16(4):2944-2959.

26. Orlikova B, Schumacher M, Juncker T, Yan CC, Inayat-Hussain SH, Hajjouli S, Cerella C, Dicato M, Diederich M. Styryl-lactone goniothalamin inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation. Food Chem Toxicol 2013;59:572-578.

27. Vendramini-Costa DB, Monteiro KM, Iwamoto LH, Jorge MP, Tinti SV, Pilli RA, de Carvalho JE. Gastroprotective effects of goniothalamin against ethanol and indomethacininduced gastric lesions in rats: Role of prostaglandins, nitric oxide and sulfhydryl compounds. Chem Biol Interact 2014;224:206-212.

28. Vendramini-Costa DB, , Alcaide A, Pelizzaro-Rocha KJ, Talero E, Ávila-Román J, Garcia-Mauriño S, Pilli RA, de Carvalho JE, Motilva V. Goniothalamin prevents the development of chemically induced and spontaneous colitis in rodents and induces apoptosis in the HT-29 human colon tumor cell line. Toxicol Appl Pharmacol 2016;300:1-12.

29. Seyed MA, Jantan I, Bukhari SN. Emerging anticancer potentials of goniothalamin and its molecular mechanisms. Biomed Res Int 2014;2014:536508.

30. Kido LA, Montico F, Sauce R, Macedo AB, Minatel E, Costa DB, Carvalho JE, Pilli RA, Cagnon VH. Anti-inflammatory therapies in TRAMP mice: delay in PCa progression. Endocr Relat Cancer 2016;23(4):235-250.

31. Sozer S, Diniz G, Lermioglu F. Effects of celecoxib in young rats: histopathological changes in tissues and alterations of oxidative stress/antioxidant defense system. Arch Pharm Res 2011;34(2):253-259.

32. de Fatima A, Kohn LK, Antonio MA, de Carvalho JE, Pilli RA. (R)-Goniothalamin: total syntheses and cytotoxic activity against cancer cell lines. Bioorg Med Chem 2005;13(8):2927-2933.

33. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. Histochem J 1979;11(4):447-455.

34. Montico F, Kido LA, Hetzl AC, Cagnon VH. Prostatic angiogenic responses in late life: antiangiogenic therapy influences and relation with the glandular microenvironment in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model. Prostate 2015;75(5):484-499.

35. Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. Clin Cancer Res 2002;8(9):2912-2923.

36. Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Dang TD, Ayala GE, Rowley DR. Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. Cancer Res 2002;62(11):3298-3307.

37. Tomas D, Kruslin B. The potential value of (Myo)fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. Prostate 2004;61(4):324-331.

38. Zar JH. Biostatistical Analysis. Upper Saddle River, NJ, USA: Prentice Hall Upper.; 1999.

39. Montico F, Hetzl AC, Candido EM, Favaro WJ, Cagnon VH. Hormonal therapy in the senescence: Prostatic microenvironment structure and adhesion molecules. Micron 2011;42(6):642-655.

40. Kido LA, Hetzl AC, Candido EM, Montico F, Lorencini RM, Cagnon VH. Antiangiogenic and finasteride therapies: responses of the prostate microenvironment in elderly mice. Life Sci 2014;106(1-2):58-70.

41. Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Munoz-Cacho P, Martinez-Taboada VM. Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. Cell Immunol 2012;273(2):124-132.

42. Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Choi JS, Yu BP. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. Microsc Res Tech 2002;59(4):264-272.

43. Debelec-Butuner B, Alapinar C, Varisli L, Erbaykent-Tepedelen B, Hamid SM, Gonen-Korkmaz C, Korkmaz KS. Inflammation-mediated abrogation of androgen signaling: an in vitro model of prostate cell inflammation. Mol Carcinog 2014;53(2):85-97.

44. Djavan B, Eckersberger E, Espinosa G., Kramer G, Handisurya A, Lee C, Marberger M, Lepor H, Steiner GE. Complex mechanisms in prostatic inflammatory response. European Urology Supplements 2009;8:872-878.

45. Hetzl AC, Favaro WJ, Billis A, Ferreira U, Cagnon VH. Prostatic diseases in the senescence: structural and proliferative features. Aging Male 2010;13(2):124-132.

46. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. N Engl J Med 1986;315(26):1650-1659.

47. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal-redux. Cancer Immunol Res 2015;3(1):1-

48. Vendramini-Costa DB, Carvalho JE. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. Curr Pharm Des 2012;18(26):3831-3852.

49. Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. Cancer Metastasis Rev 2006;25(3):409-416.

50. Narayanan NK, Nargi D, Horton L, Reddy BS, Bosland MC, Narayanan BA. Inflammatory processes of prostate tissue microenvironment drive rat prostate carcinogenesis: preventive effects of celecoxib. Prostate 2009;69(2):133-141.

51. Vykhovanets EV, Shukla S, MacLennan GT, Vykhovanets OV, Bodner DR, Gupta S. II-1 beta-induced post-transition effect of NF-kappaB provides time-dependent wave of signals for initial phase of intrapostatic inflammation. Prostate 2009;69(6):633-643.

52. Folmer F, Blasius R, Morceau F, Tabudravu J, Dicato M, Jaspars M, Diederich M. Inhibition of TNFalpha-induced activation of nuclear factor kappaB by kava (Piper methysticum) derivatives. Biochem Pharmacol 2006;71(8):1206-1218.

53. Vendramini-Costa DB, Francescone R, Posocco D, Hou V, Dmitrieva O, Hensley 4, de Carvalho JE, Pilli RA, Grivennikov S. Anti-inflammatory natural product goniothalamin reduces colitis-associated and sporadic colorectal tumorigenesis. Carcinogenesis 2016; doi:10.1093/carcin/bgw112

54. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. J Biol Chem 1994;269(7):4705-4708.

55. D'Acquisto F, Iuvone T, Rombola L, Sautebin L, Di Rosa M, Carnuccio R. Involvement of NF-kappaB in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. FEBS Lett 1997;418(1-2):175-178.

56. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. Virchows Arch 2005;446(5):475-482.

57. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. Mutat Res 2001;480-481:243-268.

58. Gupta S, Adhami VM, Subbarayan M, MacLennan GT, Lewin JS, Hafeli UO, Fu P, Mukhtar H. Suppression of prostate carcinogenesis by dietary supplementation of celecoxib in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model. Cancer Res 2004;64(9):3334-3343. 59. Narayanan BA, Narayanan NK, Pttman B, Reddy BS. Adenocarcina of the mouse prostate growth inhibition by celecoxib: downregulation of transcription factors involved in COX-2 inhibition. Prostate 2006;66(3):257-265.

60. Abedinpour P, Baron VT, Welsh J, Borgstrom P. Regression of prostate tumors upon combination of hormone ablation therapy and celecoxib in vivo. Prostate 2011;71(8):813-823.

61. Kim SH, Song SH, Kim SG, Chun KS, Lim SY, Na HK, Kim JW, Surh YJ, Bang YJ, Song YS. Celecoxib induces apoptosis in cervical cancer cells independent of cyclooxygenase using NF-kappaB as a possible target. J Cancer Res Clin Oncol 2004;130(9):551-560.8.

62. Funakoshi-Tago M, Shimizu T, Tago K, Nakamura M, Itoh H, Sonoda Y, Kasahara T. Celecoxib potently inhibits TNFalphainduced nuclear translocation and activation of NF-kappaB. Biochem Pharmacol 2008;76(5):662–671

# 9. TABLES

	YOUNG		SENILE		SNGTN		SNCEL	
	Ep	St	Ep	St	Ep	St	Ep	St
COX-2	1	2	3	3	2	3	1	1
IL-17	1	1	3	1	2	1	2	1
iNOS	2	1	3	2	2	2	1	1

**Table 1.** COX-2, IL-17 and iNOS immunoreactivities in the ventral prostate of FVB mice in the different experimental groups.

Immunoreactivity frequency distribution: 0 (0%), 1 (33%), 2 (33–66%), e 3 (66%).

## **10. FIGURES AND LEGENDS**





with smooth muscle cells intermingled with collagen fibers around of the glandular acini. **SENILE GROUP (D-F):** Atrophic glandular acini with cubic cells (a), areas with proliferative intraepithelial neoplasia (PIN), and eventual points of well-differentiated adenocarcinoma (arrow). Hyperplasia and hypertrophied smooth muscle cells (smc), increase of inflammatory cells foci (ic) and collagen fibers (green). **SENILE CELECOXIB GROUP (G-I):** Glandular epithelium with columnar cells and some atrophic regions, highlighting the partial prostatic morphology recovery. Occasional proliferative intraepithelial neoplasia (PIN) areas were still identified. The prostatic stroma showed healthy aspect, with smooth muscle cells organized and decrease of inflammatory cells. **SENILE GONIOTHALAMIN GROUP (J-L):** Simple secretory epithelium with cubic and columnar cells with folded mucosa. Some proliferative areas (PIN) were identified. A inflammatory cells decrease in the stroma was seen. Ep: epithelium; St: stroma; L: lumen. Hematoxylin-Eosin (A,B,D,E,G,I,J,K); Masson's Trichrome (C,F,H,L).

Figure 2.



**Figure 2.** COX-2, IL-17 and iNOS immunoreactivities in the ventral prostate of FVB mice from **YOUNG GROUP** (A, E, I), **SENILE GROUP** (B, F, J) **SENILE GONIOTHALAMIN GROUP** (C, G, K) and **SENILE CELECOXIB** GROUP (D, H, L). Epithelial and stromal reactivities were graded according to Table 1.





**Figure 3.** Western blotting analysis of COX-2, TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B, p-NF $\kappa$ B and iNOS levels from ventral prostate of the experimental groups. (One-way ANOVA followed by Tukey test: \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001).

Figure 4.



**Figure 4.** IL1-beta (pg/ml) plasmatic levels in FVB mice in the different experimental groups. (One-way ANOVA followed by Tukey test: \* p<0.05).

# 6. ARTIGO CIENTÍFICO III

# 1. TÍTULO

Atividade pró-apoptótica e antiproliferatva dos tratamentos com Goniotalamina e Celecoxibe na próstata de camundongos durante o envelhecimento

### 2. RESUMO

O envelhecimento está associado a alterações significativas na próstata. Nos últimos anos, o conceito de quimioprevenção emergiu como uma nova abordagem terapêutica e, estudos de diferentes compostos que visam atenuar ou retardar os efeitos do envelhecimento, bem como a prevenir o câncer, tem se revelado como estratégias promissoras. Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito protetor da Goniotalamina (GTN) e do Celecoxibe considerando-se parâmetros relacionados à processos proliferativos, apoptóticos, e de sobrevivência celular. Para as análises de Imunoistoquímica, Western Blotting, ELISA, TUNEL camundongos FVB foram divididos em: Grupos controle JOVEM (18 semanas de idade) e SENIL (52 semanas de idade). Grupos tratados: SENIL-GONIOTALAMINA (150mg/Kg via oral) e SENIL-CELECOXIBE (10mg/Kg via oral). Para análise de ressonância magnética nuclear (RMN) foram utilizados quatro grupos experimentais: JOVEM e SENIL FVB; e TRAMP (camundongos transgênicos para o adenocarcinoma de próstata) de 8 (T8) e 12 (T12) semanas de idade. Os resultados indicaram que ambos tratamentos apresentaram atividade pró-apoptótica no modelo senil, e diminuíram mediadores que propiciam o aumento da sobrevivência celular, como o STAT-3. A GTN atuou mais especificamente na diminuição dos níveis de proliferação celular através da diminuição do marcador PCNA, enquanto que a ação anti-mitogênica do Celecoxibe se evidenciou pela redução dos níveis de IGFR-1. Quanto à análise metabolômica, os resultados demonstraram aumento no metabolismo de glicerofosfolipídeos durante a senescência, e diminuição do citrato no modelo de câncer. Concluindo, este estudo confirmou a susceptibilidade do microambiente ao desenvolvimento de neoplasias através do aumento proteico e metabólico de indicadores de processos proliferativos. Além disso, ambos tratamentos foram eficazes atenuando os efeitos deletérios do envelhecimento na próstata.

## 3. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é descrito como uma das principais causas do desenvolvimento do câncer, e um dos motivos está relacionado a falha sistêmica nos processos de morte celular associado a senescência celular (1-3). Atrelado a estes fatos, o avanço da idade também pode promover disfunções na homeostase proliferativa como a hipoproliferação, que compromete a regeneração e o reparo tecidual, e a hiperproliferação, que pode levar a cânceres letais (2). Nesse contexto, a próstata se destaca como um dos principais órgãos a sofrer alterações decorrentes do avanço da idade devido à redução natural dos níveis de testosterona e aumento relativo de estrógenos, hormônios responsáveis pela manutenção e funcionamento glandular (4,5). Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa caracterizou o microambiente prostático em camundongos senis sob diferentes perspectivas, concluindo que o aumento de processos como inflamação, angiogênese e, remodelação estromal, tornam este órgão susceptível ao desenvolvimento de neoplasias (6-8). Dando suporte a essas observações, outros estudos apontaram alterações celulares da próstata associadas ao envelhecimento, tais como aumento da expressão de fatores de crescimento, aumento do estresse oxidativo e diminuição da capacidade apoptótica (9-11). Assim, à medida que o número de indivíduos idosos aumenta de forma constante na população, o desenvolvimento de medidas quimiopreventivas eficazes dirigidas diretamente contra a carcinogênese assume relevante significado (1).

O aumento da sobrevivência celular relacionados a mecanismos de evasão apoptótica possibilita a criação de vias auto-sustentáveis que estimulam a proliferação celular sem que haja controle desses processos, gerando o desequilíbrio funcional do tecido. O fator de transcrição e transdução de sinal 3 (STAT-3) é um dos responsáveis pela mediação da capacidade de sobrevivência celular e indução de genes anti-apoptóticos como BCL-2 e BCL-X (12). A contínua ativação deste fator está fortemente associada a presença de neoplasias e, no caso do câncer de próstata, sua ativação parece ser fundamental para progressão da doença (13). A via clássica da STAT-3 ocorre quando o IL-6 se liga ao seu receptor (gp130) na membrana celular onde ocorre a fosforilação da janus quinase (JAK), seguida da fosforilação do fator de transdução e transcrição de sinal do STAT, o qual é posteriormente translocado para o núcleo tornando-se ativado (14). A habilidade da IL-6 ativar diretamente os fatores de transdução e ativadores de transcrição STATs, especialmente o STAT-3, produz
importantes consequências quando examinadas no contexto da progressão de neoplasias (15). Outro importante fator relacionado a processos proliferativos é o receptor do fator de crescimento homólogo à insulina (IGFR-1), que através de sua propriedade mitogênica também está associado à progressão do câncer, incluindo o de próstata (16,17). Segundo Heidegger, et al. (18), a suplementação de IGF-1 estimulou o crescimento de linhagens de células de câncer de próstata dependentes e independentes de hormônio, e ainda revelou a capacidade oncogênica do IGFR-1. A superexpressão induzida IGFR-1 aumentou a proliferação nas linhagens celulares de câncer de próstata e induziu a diferenciação celular em células epiteliais não cancerosas, demonstrando assim a importância deste receptor tanto em processos neoplásicos, como no desenvolvimento normal do tecido prostático (18).

Sabe-se que células cancerosas exibem intensas alterações metabólicas quando comparada a células sadias, devido basicamente à capacidade de proliferação continuada, as quais requerem suprimento constante de energia (19). O câncer de próstata representa um modelo particularmente atraente para o estudo metabolômico, considerando que fortes evidências sugerem que a desregulação do metabolismo desempenha papel importante no desenvolvimento e progressão desta doença (20). No caso da tumorigênese prostática, o processo é altamente complexo e heterogêneo, a começar pelas mudanças no metabolismo de citrato e zinco, o qual é amplamente descrito na literatura (19). Alterações metabólicas de células cancerosas da próstata caracterizam um metaboloma distinto e específico deste órgão, que pode ser capturado por meio da descrição do perfil metabolômico (20). No entanto, a literatura é escassa no que diz respeito à análise metabolômica da próstata durante o envelhecimento com enfoque na descrição de potenciais marcadores que predispõe esse órgão ao desenvolvimento do câncer. Assim sendo, os avanços no conhecimento e elucidação de mecanismos envolvidos no câncer de próstata requerem a disponibilidade de diferentes modelos experimentais, como modelos que exibam alto risco ao desenvolvimento de doenças letais. Isso também se aplica a questões como o desenvolvimento e testes de agentes farmacológicos para o prevenção e tratamento de neoplasias (21).

No presente estudo, o potencial anti-proliferativo e pró-apoptótico do anti-inflamatório Celecoxibe e da Goniotalamina foi avaliado como terapias quimiopreventivas na próstata de animais senis. Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram que ambas as drogas atrasaram a progressão do adenocarcinoma prostático em camundongos transgênicos para o adenocarcinoma de próstata (TRAMP) através da redução de mediadores de sobrevivência e proliferação celular (16). Ainda, no modelo senil FVB, tanto o uso da Goniotalamina, quanto do Celecoxibe foi benéfico para aspectos morfológicos e diminui os níveis de diferentes mediadores inflamatórios na próstata. Desta maneira, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito protetor da Goniotalamina e do Celecoxibe considerando-se parâmetros relacionados à processos de sobrevivência celular, proliferativos e apoptóticos. Além disso, a fim de caracterizar o potencial do microambiente prostático senil para o desenvolvimento do câncer, o presente estudo ainda propôs um novo método de avaliação fundamentado na comparação do perfil metabolômico da próstata de animais senis com a próstata de camundongos TRAMP.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### Animais e tratamentos

Camundongos machos da linhagem FVB foram divididos em quatro grupos experimentais. Os grupos controle jovem de 18 semanas de idade (n= 20) e senis de 52 semanas de idade (n=20), os quais receberam os veículos carboximetilcelulose (CMC) 0,05% ou solução salina tamponada com fosfato (PBS) + Tween 80 a 1% (10 mL/ Kg) via oral. Os grupos tratados dividiram-se em: grupo senil Goniotalamina (SNGTN / 52 semanas de idade / n = 15), que recebeu 150mg/Kg de Goniotalamina (GTN) por via oral três vezes por semana durante 30 dias (16); e o grupo senil Celecoxibe (SNCEL / 52 semanas de idade / n = 15) que foi tratado por via oral com 10 mg / Kg de Celecoxibe, cinco vezes por semana durante 30 dias (16).

Para as análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram utilizados camundongos machos FVB, e camundongos transgênicos para o adenocarcinoma de próstata (C57BL/6-Tg (TRAMP) 8247Ng/JX FVB/Unib F1/J), os quais foram divididos nos

grupos JOVEM (JV/ 18 semanas de idade/ n=18); SENIL (SEN/ 52 semanas de idade / n = 18); TRAMP 8 (T8 / 8 semanas de idade/ n=18) e TRAMP 12 (T12/ 12 semanas de idade/ n=18). Para esta análise os animais não receberam nenhum tratamento.

Todos os camundongos foram obtidos do Centro Multidisciplinar de Pesquisa Biológica em Ciência Animal de Laboratório (CEMIB) da Universidade de Campinas (UNICAMP) e receberam água e dieta sólida ad libitum (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil). Este estudo foi aprovado pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisa Animal (Universidade de Campinas - UNICAMP, protocolo nº 3119-1).

A preparação de Goniotalamina seguiu o procedimento publicado por de Fatima, et al. (22), e foi emulsionada com Tween 80 a 1% (Synth, Diadema, SP, Brasil) e dissolvida em solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,0 (23). O Celecoxibe (CELEBRA / Pfizer Pharmaceuticals LLC, Caguas, Porto Rico) foi diluído em CMC 0,05% (24).

#### Imunoistoquímica

Amostras prostáticas de 5 animais de cada grupo experimental, os mesmos utilizados para a microscopia de luz, foram utilizadas para as imunomarcações seguindo o protocolo experimental descrito previamente por Montico et al. (25). Os anticorpos utilizados para detecção do receptor de andrógeno (AR) (sc-816, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), fator de transcrição e transdução de sinal 3 (STAT-3) (sc-7179 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e fator de crescimento homólogo à insuina (IGFR-1) (sc-712- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) foram diluídos em BSA 1% concentração de na 1:50 e as lâminas incubadas overnight a 4 °C. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário HRP conjugado proveniente do kit Envision (Dako) por 40 minutos e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB), contra-corados com Hematoxilina de Harris e avaliados no fotomicroscópio Nikon Eclipse E-400 (Nikon, Tóquio, Japão). A marcação positiva para cada antígeno foi determinada pela presença da coloração acastanhada da reação do DAB, e baseada na análise de 10 campos não sobrepostos para cada animal. A imunoreatividade foi graduada de acordo com a

porcentagem de área imunomarcada, sendo classificada como: 0 (zero) para coloração negativa (0%), 1 como coloração fraca (<33%), 2 para coloração moderada (33%-66%) e 3 para coloração intensa (>66%) de acordo com a frequência da marcação dos antígenos nas secções de tecido prostático (modificado de 26,27,28). Para todas análises Imunoistoquímicas foi realizado o controle negativo, no qual o anticorpo primário não é utilizado.

## Western Blotting

Amostras do lobo ventral foram coletadas de 5 animais de cada grupo experimental e pesadas, homogeneizadas em tampão de extração RIPA (R0278-Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). Os extratos dos tecidos foram obtidos por centrifugação durante 20 minutos a 14000 rpm a 4ºC e utilizados na determinação da concentração de proteínas, usando o reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). As amostras foram misturadas (1:1) com tampão de amostra 3X (100mM Tris-HCl pH 6.8, 10% $\beta$ -mercaptoetanol, 4% SDS e 20% glycerol), incubadas em banho seco a 100°C por 5 minutos. O correspondente a 35 microgramas de proteínas foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente (Sistema Hoefer) para membranas de nitrocelulose (Amersham) a 120 V por 1 hora e meia. As membranas foram então bloqueadas com BSA 3% diluído em TBS-T por uma hora e incubadas com os anticorpos primários AR (sc-816, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), STAT-3 fosforilado (3E2, Cell Signaling Technology, Danvers, EUA); IGFR-1 (sc-712- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); BCL-2 (#3869 - Cell Signaling Biotechnology, Danvers, EUA) e o marcador nuclear de proliferação celular (PCNA) (ab-29 – Abcam, Cambridge, MA, EUA) com diluição variando entre 1:250 – 1:500. Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários anti-rabbit ou anti-mouse HRP conjugados na diluição de 1:6000 em BSA 1%. Após nova série de lavagens com TBS-T, foi acrescentado 2 ml de solução quimioluminescente (Super Signal West Pico Chemiluminescent/ThermoScientific/ 34080) e atividade da peroxidase foi revelada por um sinal luminescente das bandas de Western Blotting, as quais foram capturadas pelo equipamento GeneGnome (Syngene,

Cambridge, UK). As intensidades da marcação obtidas para as diferentes moléculas foram determinadas por densitometria através do programa de análise de imagens Image J (Image Analysis and Processing in Java) Anticorpo para β-actina (sc 81178- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) foi usado como controle endógeno.

## TUNEL

A fragmentação do DNA de células apoptóticas foi detectada pelo sistema de TUNEL (Dead End™ Fluorometric TUNEL System, Promega, Madison WI, USA), de acordo com as intruções do fabricante. As células apoptóticas foram identificadas e capturadas pelo fotomicroscópio invertido Olympus IX71 inverted-II (Olympus, California, USA) equipado com sistema de fluorescência. Para a análise, 10 campos aleatórios para cada animal foram capturados no aumento de 40x. A contagem total das células por campo foi realizada no filtro DAPI, enquanto as células em apoptose foram contadas no filtro FITC onde fluoresceram em verde. O indice apoptótico foi determinado pela divisão do número de núcleos apoptóticos pelo número total de núcleos encontrados nos campos avaliados (8).

### ELISA

Amostras de sangue foram centrifugadas (centrifuga refrigerada Sigma® 3-18K) a 3000 rpm, por 10 minutos. O plasma obtido foi utilizado para determinar a dosagem dos níveis da interleucina 6 (IL-6), utilizando-se reagentes comerciais pelo método imunoenzimático (Quantikine®, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). As absorbâncias das amostras foram lidas utilizando-se o equipamento Multi-Mode Microplate Reader Model Synergy H1M (Bio-Tek Instruments) com comprimento de onda de 450 nm.

#### Ressonância Magnética Nuclear (1H-RMN)

Para análise de ressonância magnética nuclear (RMN) foi utilizado o Espectrômetro Varian Inova 600 MHz, pertencente ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). As amostras da próstata ventral foram agrupadas em *pools*, uma vez que a quantidade de tecido

de uma única amostra foi insuficiente para leitura de RMN. Sendo assim, cada grupo experimental apresentou pelo menos 4 *pools* compostos de 3 amostras cada. Após a formação dos *pools*, as amostras foram pesadas novamente e homogeneizadas no Polytron (Kinematica) em metanol (8mL/g) e água milliQ gelada (8mL/g). Posteriormente, clorofórmio (8mL/g) e água milliQ gelada (4mL/g) foram adicionados na mistura e agitados no vortex por 60s. O extrato permaneceu no gelo por 10 minutos e em seguida foi centrifugado durante 5 minutos a 2000G (4°C). Após a centrifugação, as amostras apresentaram duas frações, das quais somente a fração polar (superior) foi aliquotada e acondicionada a -80°C (modificado de 29). Para a preparação da leitura as amostras foram liofilizadas por pelo menos 18 horas.

Para referência de concentração (visando a quantificação dos metabólitos) foi preparada uma solução estoque de TSP (ácido 3-(trimetil-silil)-2,2',3,3'- tetradeuteropropiônico ou TMSP-d4) a 50 mmol/L em água deuterada (D<sub>2</sub>O), armazenada ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Assim, os extratos liofilizados foram ressuspendidos em 540µL de D<sub>2</sub>O (dissolução do liofilizado); 60µL de tampão fosfato 1 mol/L em D<sub>2</sub>O (padronização do pH); 6,06µL de solução de TSP 50 mmol/L (referência interna). O resultado foi uma solução final de 600,6µL em D<sub>2</sub>O, com concentrações de 0,5mmol/L de TSP e 100mmol/L de tampão fosfato (30).

A sequência de pulsos "1Dpresat" é a mais usual das sequências de pulsos de uma dimensão e foi empregada nesta análise. Foram realizados 1024 scans, com intervalos entre scans ("*delays*") de 1,5 segundos, janela de leitura de 16 ppm, tempo de aquisição de 4 segundos e 25º C de temperatura. O espectro também foi normalizado pelo valor de TSP, um aditivo que é utilizado como referência interna. Os picos observados foram identificados e o software Chenomx NMR Suite (Versão 7.1; Chenomx Inc., Edmonton, Canadá), foi utilizado para o tratamento dos dados obtidos e para análise qualitativa e quantitativa dos metabólitos presentes na amostra.

### Análise Estatística

Paras a análise estatística foram empregados a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação entre médias.

Os testes estatísticos realizados exclusivamente para análise de RMN foram realizados na plataforma online Metaboanalyst. Foram empregadas análises de variância ANOVA, testet, análise de componentes principais (PCA), a qual agrupa as amostras de acordo com suas maiores similaridades, e análise de discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), que tem por objetivo reduzir a dimensão informacional a fim de destacar similaridades ou diferenças através da organização preferencial de componentes principais que se mostrem correlacionadas com uma variável classificatória (30). Antes da realização das análises multivariadas os dados ainda foram normalizados pela área. Para tal, cada valor das variáveis de uma amostra foi dividido pela somatória dos valores de todas as variáveis daquela mesma amostra, tornando-as comparáveis entre si (30).

Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5% (31).

## 5. RESULTADOS

#### Imunoistoquímica e Western blotting

## AR

A imunolocalização do receptor de andrógeno apresentou-se reduzida no epitélio prostático dos animais senis quando comparado ao grupo jovem (Figura 1a, b; Tabela 1). Por outro lado, após os tratamentos com GTN e Celecoxibe a frequência da marcação deste receptor aumentou no compartimento epitelial, enquanto que no estroma manteve-se similar ao grupo senil (Figura 1b-d; Tabela 1). Os resultados de western blotting seguiram a mesma tendência verificada na Imunoistoquímica, contudo o aumento promovido pelo Celecoxibe não foi significativo. O nível proteico de AR aumentou significativamente no grupo SNGTN e também no grupo jovem quando comparados aos animais senis (Figura 2a).

#### STAT-3 e pSTAT-3

Os animais do grupo controle jovem apresentaram imunoreatividade epitelial moderada e estromal fraca para STAT-3 (Figura 1e; Tabela 1). Já no grupo senil, intensa reatividade nuclear e citoplasmática para STAT-3 foi identificada no compartimento epitelial, principalmente em regiões morfologicamente alteradas. No estroma prostático a imunomarcação de STAT-3 apresentou-se moderada no núcleo das células musculares lisas e intensa no citoplasma. (Figura 1f; Tabela 1). O tratamento com GTN resultou somente na diminuição da imunomarcação nuclear de STAT-3 no epitélio, sendo esta moderada (Figura 1g; Tabela 1). Por outro lado, o Celecoxibe diminuiu a imunomarcação deste fator em ambos compartimentos prostáticos (Figura 1h; Tabela 1).

Em relação aos níveis proteicos do STAT-3 ativo, a forma fosforilada p-STAT-3, foi constatada redução significativa nos grupos tratados com GTN e Celecoxibe em relação ao grupo controle senil (Figura 2b).

## IGFR-1

A imunolocalização do IGFR-1 apresentou frequência reduzida no grupo controle jovem em relação ao grupo controle senil, o qual caracterizou-se principalmente pela intensa positividade estromal (Figura 1i, j; Tabela 1). Os tratamentos com Celecoxibe e Goniotalamina levaram a redução da frequência da reatividade para IGFR-1 em relação ao grupo controle senil (Figura 1k, I; Tabela 1). Na análise de western blotting somente o grupo tratado com Celecoxibe apresentou redução estatisticamente significativa em relação ao grupo controle senil (Figura 2c).

# BCL-2

Em relação aos níveis da proteína anti-apoptótica BCL-2, foi identificado aumento significativo na próstata de camundongos senis quando comparados ao grupo jovem. O tratamento com GTN foi o único a diminuir significativamente os níves de BCL-2 na próstata (Figura 2d).

#### PCNA

A análise de Western blotting para o marcador de proliferação celular PCNA indicou diminuição significativa dos níveis desta proteína na próstata de animais tratados com GTN em relação ao grupo senil. Os demais grupos experimentais não apresentaram diferença estatisticamente significativa (Figura 2e).

## TUNEL

Os resultados demonstraram diminuição significativa do índice apoptótico na próstata dos animais senis em relação aos jovens. Paralelamente, ambos tratamentos experimentais propiciaram aumento significativo do percentual da taxa de apoptose na próstata dos animais senis (Figura 3a-d).

# ELISA

A análise imunoenzimática do plasma sanguíneo de camundongos senis indicou o aumento significativo IL-6 em relação ao grupo jovem. Nos grupos tratados com Goniotalamina e Celecoxibe não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle senil, embora tenha sido observado redução numérica da concentração plasmática desta citocina pró-inflamatória (Figura 4a).

## **RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (1H-NMR)**

As amostras da próstata ventral de animais senis FVB e TRAMP no início do desenvolvimento de lesões neoplásicas foram submetidos à análise de RMN, onde 25 metabólitos foram selecionados e quantificados (Tabela 2). Os resultados estatísticos a partir da análise de variância demonstraram níveis significativamente elevados de citrato, fosfocolina e fosfoetanolamina (Figura 5a,c,d) na próstata de camundongos senis em relação aos grupos TRAMP. Enquanto que níveis significativamente aumentados de alanina foram observados na próstata de camundongos TRAMP de ambas idades em relação ao grupo senil (Figura 5b).

A análise de PCA não segregou o grupo senil dos animais TRAMP no início do desenvolvimento do câncer de próstata, sugerindo que as diferenças entre os grupos relacionadas ao potencial desenvolvimento de lesões prostáticas não foram relevantes do ponto de vista metabólico (Figura 6a). Já a PLS-DA segregou quase totalmente o grupo senil dos grupos TRAMP, indicando diferenças metabólicas específicas entre esses dois modelos, principalmente relacionadas às concentraçãoes de citrato, alanina, fosfocolina e fosfoetanolamina (Figura 7a). Nessa análise também foi medida o índice de importância da variável na projeção (VIP), o qual define a contribuição que uma variável faz ao modelo. A Figura 7b mostra os 15 metabólitos que mais contribuíram para a discriminação de classes no modelo PLS-DA.

Além disso, considerando as diferenças encontradas no modelo senil FVB versus TRAMP, ainda realizamos o teste-t para comparar o perfil desses metabólitos com a próstata de animais jovens (Figura 8a-c). Apesar dos resultados apresentarem aumento numérico dos metabólitos avaliados na próstata dos animais senis, não foi identificada diferença estatisticamente significativa.

### 6. DISCUSSÃO

No presente estudo diferentes parâmetros relacionados à processos proliferativos e apoptóticos foram avaliados na próstata de camundongos senis, os quais foram submetidos aos tratamentos com GTN e Celecoxibe. Os resultados demonstraram que durante o envelhecimento a próstata apresentou aumento da imunoexpressão de proteínas relacionadas à proliferação celular e, também, anti-apoptóticas, confirmando a susceptibilidade do microambiente prostático ao desenvolvimento de neoplasias neste período de vida. A GTN contribuiu de forma específica na diminuição dos níveis do marcador de proliferação celular (PCNA), da proteína anti-apoptótica BCL-2 e, também, aumentando o nível de apoptose celular após o tratamento. Paralelamente, o tratamento com Celecoxibe se destacou pela diminuição dos níveis do fator mitogênico IGFR-1, como também pelo aumento significativo da taxa de apoptose.

A morte celular através da apoptose desempenha um papel crítico na homeostase da próstata normal, bem como no desenvolvimento do câncer (32). O processo de apoptose ocorre por duas vias, intrínseca ou mitocondrial e extrínseca, se diferenciando pelo tipo de estímulo que desencadeará a morte celular (33). A BCL-2 é uma proteína anti-apoptótica encontrada na membrana externa da mitocôndria, que participa dos mecanismos de morte celular pela via intrínseca, juntamente com outras proteínas através do bloqueio da liberação do citocromo c (34,35). Os presentes resultados apontaram aumento dos níveis de BCL-2 na próstata de animais senis em relação ao grupo jovem, confirmando a susceptibilidade do microambiente prostático senil à mecanismos de evasão apoptótica, o que pode levar ao desequilíbrio glandular de modo geral. Diferentes estudos têm correlacionado a elevada expressão da BCL-2 ao envelhecimento e, também, ao avanço do adenocarcinoma prostático para um perfil de maior agressividade e de independência androgênica (36-39). Níveis elevados de BCL-2 na próstata também foram observados após ablação androgênica por castração, e revertido após a administração de testosterona, concluindo que a superexpressão desta proteína foi consequência direta da baixa hormonal (36). No presente estudo, concomitante ao aumento dos níveis de BCL-2 na próstata senil também se verificou a diminuição de AR no mesmo grupo, o que certamente influenciou na capacidade apoptótica das células prostáticas.

Com relação a GTN, os dados apresentados mostraram que o tratamento foi capaz de aumentar significativamente o percentual relativo de células, e o único a diminuir os níveis de BCL-2 apoptóticas na próstata dos animais senis. Inayat-Hussain, et al. (40) verificaram o potencial pró-apoptótico da GTN em células leucêmicas T através da ativação das caspases 3 e 7 durante a morte celular. Outro estudo dos mesmos autores provou que a GTN induziu a apoptose através de danos ao DNA e estresse oxidativo (41). Neste estudo, Inayat-Hussain et al. (41) verificaram redução dos níveis de BCL-2 após o tratamento com GTN, todavia, este resultado não demonstrou ser determinante para a morte celular. Em contrapartida, outros autores observaram que o tratamento com GC-51, estiril lactona análoga à GTN, diminuiu a expressão gênica da BCL-2, aumentou da expressão gênica de BAX e a ativação da caspase-

3 na linhagem celular de leucemia promielocítica HL-60 (42). O desequilíbrio na regulação da expressão gênica entre BCL-2 e BAX, ocasionado pelo GC-51, tornou as células HL-60 mais sensíveis à indução apoptótica (42). Assim, com base nos resultados do presente estudo e a correlação com a literatura, é possível afirmar que a GTN também é capaz de estimular o processo de apoptose *in vivo*. Por outro lado, apesar da diminuição dos níveis de BCL-2 sugerir contribuição para o estímulo da apoptose, nossas análises não permitem afirmar se esta redução foi crucial no aumento da morte celular após o tratamento, ou consequência indireta da ação da GTN em outras vias.

Semelhantemente ao tratamento com GTN, o tratamento com Celecoxibe aumentou significativamente o índice apoptótico na próstata de animais, confirmando sua ação próapoptótica já verificada na literatura. A ação pró-apoptótica do Celecoxibe também foi verificada no trabalho que seguiu a mesma metodologia utilizada do presente estudo, onde foi observada concomitante redução dos níveis proteicos de COX-2 e IGFR-1 na próstata de camundongos TRAMP (16). Análises com outros inibidores da COX-2, como SC-58125 e NS398, reportaram aumento da apoptose de células de câncer de cólon e próstata através da diminuição dos níveis de BCL-2 (43,44). Por outro lado, o estudo de Hsu et al. (45) indicou que o tratamento com Celecoxibe não alterou os níveis de BCL-2 em linhagens de células prostáticas cancerosas LNCAP e PC3. Ainda, os mesmos autores reportaram que células PC-3, transfectadas para expressar altos níveis de BCL-2, não foram resistentes à apoptose mediante ao tratamento com Celecoxibe. Como conclusão este estudo afirmou que a morte celular resultante da ação do Celecoxibe ocorreu pelo bloqueio da fosforilação da Akt, independentemente da BCL-2 (45). De forma semelhante, os níveis de BCL-2 não foram alterados no presente estudo, fato que sugeriu que os efeitos pró-apoptóticos do Celecoxibe ocorreram, provavelmente, por outra via diferente da BCL-2.

Elevados níveis de IGF-1 associados ao aumento da atividade e expressão do IGFR-1, tem sido correlacionados ao aumento processos proliferativos e redução da morte celular, podendo desencadear transformações neoplásicas em diferentes órgãos, incluindo a próstata (46). Nossos resultados demonstraram aumento da imunoexpressão do IGFR-1 na próstata dos animais senis em relação aos jovens, indicando aumento do potencial mitogênico desta proteína durante o envelhecimento. Em concordância com os resultados do presente estudo, Montico et al. (2014) observaram elevados níveis de IGFR-1 no lobo dorsolateral de camundongos FVB senis e, no modelo TRAMP de 8 e 12 semanas de idade. Ainda, estes mesmos autores destacaram o desequilíbrio no microambiente prostático de animais senis caracterizados pelo aumento da remodelação tecidual, fatores mitogênicos envolvidos em processos de invasão e proliferação celular e angiogênese, como elementos importantes no surgimento de lesões pré-neoplásicas.

Em relação aos tratamentos do nosso estudo, foi observado que ambos levaram a diminuição da imunomarcação do IGFR-1. Contudo, na análise de Western Blotting somente o tratamento com Celecoxibe diminuiu significativamente os níveis desse receptor. A relação entre o bloqueio da COX-2 e a diminuição dos níveis de IGFR-1 não é bem esclarecida na literatura. Todavia, a expressão gênica de COX-2 e a síntese de prostaglandinas na linhagem de células de câncer de cólon humano pode ser regulada pela via dos receptores de IGF-1 e IGF-2 (47). O estudo de Liu et al. (48) abordou a relação entre os efeitos do Celecoxibe no crescimento induzido por IGF-1 em células de carcinoma pulmonar humano, verificando que o tratamento inibiu o crescimento e capacidade de invasão dessas células e, ainda, diminuiu a expressão IGFR-1. Os mesmos autores descreveram que esses resultados ocorreram independentemente do bloqueio da COX-2, sugerindo que a ação exercida pelo tratamento Celecoxibe foi resultante do bloqueio da via da AKT, a qual tem papel fundamental em processos prolíferação celular, invasão e metástase. A via AKT também é conhecida por desempenhar um papel crítico na apoptose por meio da inibição de proteínas pro-apoptóticas e ativação de fatores anti-apoptóticos (49).

Embora os resultados dos níveis proteicos não tenham confirmado a ação da GTN na redução do IGFR-1, outro estudo do nosso grupo de pesquisa observou a redução deste fator de crescimento após os tratamentos com GTN e Celecoxibe na próstata de camundongos TRAMP (16). Assim sendo, concluímos que a redução dos níveis de IGFR-1, resultante do tratamento com Celecoxibe, comprovou a ação benéfica deste tratamento na regulação de

processos mitogênicos da próstata de animais senis. Além disso, esses resultados sugerem um mecanismo de ação alternativo do Celecoxibe além da inibição da COX-2, ressaltando o potencial amplo espectro de ação deste medicamento, além da sua capacidade como antiinflamatório já comprovada.

No presente estudo, o grupo senil não só apresentou aumento significativo da imunoreatividade do STAT-3 e dos níveis proteicos do pSTAT-3, como também níveis significativamente elevados de IL-6, sua principal ativadora. A literatura apontou que o aumento da expressão do STAT-3 também está relacionado com o surgimento e avanço de diversos tipos de tumores, como os de próstata (15). Isto foi considerado, uma vez que este fator tem como principal função aumentar a capacidade de sobrevivência celular e induzir a expressão de genes anti-apoptóticos como BCL-2 e BCL-X (12). Outro importante tópico desta via é a múltipla capacidade de ação da IL-6. Rojas, et al. (50) observaram que a ação parácrina da IL-6 em células prostáticas provocou aumento da fosforilação do IGFR-1 mesmo sem a presença dos ligantes IGF-1 e IGF-2 e, além disso, que inibição do STAT-3 provocou a direta inibição da fosforilação do IGFR-1. Assim, a IL-6 foi capaz de estimular a tumorigênese prostática através da ativação STAT-3, bem como a ativação cruzada do IGFR-1 (50). No câncer de próstata, a IL-6 facilita a progressão da doença levando ao desenvolvimento mais agressivo andrógeno-independência através da ativação do AR sob ausência de andrógenos, além de estimular o processo inflamatório (50). Em conjunto esses resultados ressaltaram a importância da via do STAT-3 na próstata durante o envelhecimento, e seu possível envolvimento como iniciadora de processos neoplásicos. Ainda, estes autores ressaltaram a interação das vias do IL-6, STAT-3, IGFR-1 e AR no desenvolvimento do câncer e demonstram a importância de investigá-las em conjunto, assim como foi feito no presente estudo.

Quantos aos tratamentos, ambos foram capazes de reduzir a imunoreatividade e níveis proteicos do STAT-3, sendo a ação do Celecoxibe mais expressiva nessa modulação. O único trabalho que ressalta a ação da GTN na via do STAT-3 foi publicado por nosso grupo de pesquisa, onde verificou-se a diminuição significativa após o tratamento de resposta

imediata e tardia com a GTN na próstata de camundongos TRAMP (16). Os mesmos autores registraram diminuição dos níveis do STAT-3 também após o uso do Celecoxibe. A literatura especializada é escassa quanto aos efeitos do bloqueio da COX-2 na via do STAT-3, principalmente na próstata. Liu et al. (51) foram um dos poucos autores a registrarem a correlação entre essas vias em células da próstata, onde concluíram que o aumento da expressão de COX-2 e prostaglandinas contribui para a progressão e desenvolvimento do câncer de próstata através da ativação da IL-6. Desta maneira, o bloqueio da COX-2 pode ser uma das maneiras de inibição da ativação da via do STAT-3, e consequentemente um inibidor de processos proliferativos.

Os resultados do presente trabalho também demonstraram a diminuição significativa do marcador de proliferação celular-PCNA na próstata dos animais senis após o tratamento com GTN. Em concordância com esses resultados, a GTN também reduziu significativamente a taxa de proliferação celular na próstata de camundongos TRAMP, retardando a progressão da doença (16). Além disso, Vendramini-Costa et al. (52) também demonstraram que tratamento com GTN reduziu a taxa de proliferação celular (PCNA) no cólon de camundongos *knockout* para IL-10, ou seja, pré-dispostos a desenvolverem doenças inflamatórias crônicas. É importante ressaltar que, o PCNA está envolvido em diversos processos fundamentais para o funcionamento celular, sendo indispensável para manutenção da integridade genômica (53). Considerando que o crescimento celular é requisito é primordial para a progressão do câncer desde estágios iniciais, e o PCNA é fator indispensável para replicação do DNA, a inibição desta proteína é considerada uma importante estratégia no tratamento de neoplasias (53). Desta maneira, os resultados aqui apresentados confirmaram a ação antiproliferativa da GTN na próstata de animais senis, indicando seu potencial preventivo no aparecimento de neoplasias nesta fase da vida.

Com relação à ressonância magnética nuclear, os resultados revelaram níveis significativamente elevados de citrato na próstata de animais senis em relação aos camundongos de TRAMP 12 semanas de idade, mas não em relação aos animais 8 semanas de idade. Costello et al. (21) demonstraram similaridades entre as alterações metabólicas

123

encontradas no câncer humano e no TRAMP, principalmente com relação a redução dos níveis de citrato e zinco. Outros autores ao descreverem o perfil metabolômico do TRAMP em estado avançado da doença, também constataram diminuição dos níveis de citrato como fortemente associada a diminuição de zinco (54). É conhecido que a perda de zinco transforma células normais "citrato-produtoras" em células malignas "citrato-oxidantes", as quais proveem fontes metabólicas sintéticas e bioenergéticas alternativas para o crescimento tumoral na próstata (55-57). Assim sendo, os presentes resultados não só confirmaram o que se sabe sobre a relação do citrato e o câncer de próstata através da redução desse metabólito no grupo TRAMP de 12 semanas de idade quando comparado aos animais senis, como também indicaram este metabólito como importante "*hallmark*" metabolômico do início e progressão do grau de lesões pré-neoplásicas.

Entre as características metabólicas do câncer prostático humano está o aumento dos derivados de colina e etanolamina, ambas fosfolipídeos de membrana (58,59). Os presentes resultados relevaram níveis significativamente elevados de fosfocolina e fosfoetano lamina nos camundongos FVB senis em relação ao TRAMP, destacando a intensidade das transformações metabólicas na próstata durante o envelhecimento. Embora não significativo, é importante ressaltar o tentende aumento desses metabólitos na próstata de camundongos senis quando comparado ao grupo jovem. Teichert et al. (54) compararam a próstata de camundongos jovens sadios com camundongos TRAMP de 8 semanas de idade, observando aumento da razão entre glicerofosfocolina e fosfocolina. No que diz respeito ao metabolismo da colina, esse resultado sugeriu que em estágios iniciais da carcinogênese, o modelo TRAMP passa por alterações metabólicas similares ao câncer humano (54). Outro estudo concluiu que os metabólitos contendo etanolamina podem contribuir tanto para o pico de colina total como metabólitos que contém colina devido à proximidade no espectro (60). Os mesmos autores ainda verificaram níveis elevados de fosfocolina em amostras de obtidas de pacientes com câncer de próstata quando comparado a amostras de hiperplasia benigna prostática. Entre as possíveis explicações para as diferenças entre o grupo senil e TRAMP está a diferença da linhagem, a qual pode ter gerado essa disparidade. Em segundo lugar, a ausência de um grupo de estágio avançado de câncer para poder avaliar a resposta dos fosfolipídeos de membrana conforme a progressão da doença. Assim sendo, os presentes resultados indicaram que o metabolismo de lipídeos de membrana pode ser indicativo de alterações relacionadas a processos neoplásicos no animal senil.

Assim como o citrato, a alanina é produto final da oxidação do glutamato, a qual é considerada a maior fonte de obtenção energética no câncer (61). Acredita-se que elevadas concentrações de alanina sejam resultantes do processo de formação de novas membranas (lipogênese) e, também, do aumento da síntese proteica em células de câncer em proliferação (62), fato que condiz com as características glandulares do modelo TRAMP.

Os presentes resultados confirmaram o aumento da produção de alanina no modelo TRAMP, quando comparado aos animais senis. Através desse resultado, e juntamente com os dados da análise de PLS-DA, é possível inferir que a próstata do camundongo senil ainda não exibe alterações significativas no metabolismo energético, principalmente relacionados ao consumo de glicose, glutamina e produção de alanina.

Finalizando, com base nos resultados apresentados confirmamos que a senilidade está relacionada ao aumento de processos proliferativos na próstata, bem como da sobrevivência celular. A GTN mostrou-se efetiva na estabilização do processo proliferativo de forma direta. Já o Celecoxibe atingiu indiretamente mecanismos envolvidos nesse processo. Tanto a GTN quanto o Celecoxibe estimularam a apoptose celular, sugerindo a capacidade citotóxica dos tratamentos. Além disso, os resultados aqui apresentados demonstraram mais uma vez a importância de se traçar o perfil completo da biologia da próstata durante o envelhecimento, no desenvolvimento de neoplasias e frente aos tratamentos quimiopreventivos. Assim, ambos tratamentos demonstraram ação benéfica no microambiente prostático e atenuaram os efeitos decorrentes do processo de envelhecimento.

A análise metabolômica da próstata senil chamou a atenção e indicou novos questionamentos a respeito do grau de similaridade entre um microambiente potencialmente propenso ao desenvolvimento de neoplasias com o modelo animal para o câncer de próstata, e novos métodos de análise se fazem necessários para a confirmação destas respostas. Através dos dados obtidos foi possível afirmar que dentre os diferentes metabólitos analisados, a via do metabolismo lipídico se destacou nos animais senis podendo ser alvo de diferentes abordagens terapêuticas.

# 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. DePinho RA. The age of cancer. Nature 2000;408(6809):248-254.
- Campisi J, Sedivy J. How does proliferative homeostasis change with age? What causes it and how does it contribute to aging? The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences 2009;64(2):164-166.
- Lu B, Chen H, Hong-Guang H. The relationship between apoptosis and aging. . Advances in Bioscience and Biotechnology 2012;3:705-711.
- 4. Ellem SJ, Risbridger GP. Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. J Steroid Biochem Mol Biol 2010;118(4-5):246-251.
- Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR, Baltimore Longitudinal Study of A. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 2001;86(2):724-731.
- Montico F, Kido LA, San Martin R, Rowley DR, Cagnon VH. Reactive stroma in the prostate during late life: The role of microvasculature and antiangiogenic therapy influences. The Prostate 2015;75(14):1643-1661.
- Kido LA, Montico F, Vendramini-Costa DB, Pilli RA, Cagnon VH. Goniothalamin and Celecoxib Effects During Aging: Targeting Pro-Inflammatory Mediators in Chemoprevention of Prostatic Disorders. The Prostate 2017.
- Kido LA, Hetzl AC, Cândido EM, Montico F, Lorencini RM, Cagnon VH. Antiangiogenic and finasteride therapies: responses of the prostate microenvironment in elderly mice. Life sciences 2014;106(1-2):58-70.
- Zhao H, Patra A, Yeh CC, Tanaka Y, Oh BR, Dahiya R. Effects of aging on growth factors gene and protein expression in the dorsal and ventral lobes of rat prostate. Biochemical and biophysical research communications 2002;292(2):482-491.
- 10. Minelli A, Bellezza I, Conte C, Culig Z. Oxidative stress-related aging: A role for prostate cancer? Biochimica et biophysica acta 2009;1795(2):83-91.
- 11. Kavathia N, Jain A, Walston J, Beamer BA, Fedarko NS. Serum markers of apoptosis decrease with age and cancer stage. Aging 2009;1(7):652-663.
- 12. Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? J Clin Invest 2002;109(9):1143-1148.

- Ni Z, Lou W, Leman ES, Gao AC. Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells. Cancer research 2000;60(5):1225-1228.
- 14. Culig Z, Puhr M. Interleukin-6: a multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer. Mol Cell Endocrinol 2012;360(1-2):52-58.
- 15. Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. Eur J Cancer 2005;41(16):2502-2512.
- Kido LA, Montico F, Sauce R, Macedo AB, Minatel E, Costa DB, Carvalho JE, Pilli RA, Cagnon VH. Anti-inflammatory therapies in TRAMP mice: delay in PCa progression. Endocrine-related cancer 2016;23(4):235-250.
- 17. Montico F, Kido LA, Hetzl AC, Lorencini RM, Candido EM, Cagnon VH. 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. Histochemistry and cell biology 2014;142(3):269-284.
- Heidegger I, Massoner P, Sampson N, Klocker H. The insulin-like growth factor (IGF) axis as an anticancer target in prostate cancer. Cancer letters 2015;367(2):113-121.
- 19. Twum-Ampofo J, Fu DX, Passaniti A, Hussain A, Siddiqui MM. Metabolic targets for potential prostate cancer therapeutics. Curr Opin Oncol 2016;28(3):241-247.
- Kelly RS, Vander Heiden MG, Giovannucci E, Mucci LA. Metabolomic Biomarkers of Prostate Cancer: Prediction, Diagnosis, Progression, Prognosis, and Recurrence. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 2016;25(6):887-906.
- 21. Costello LC, Franklin RB, Zou J, Feng P, Bok R, Swanson MG, Kurhanewicz J. Human prostate cancer ZIP1/zinc/citrate genetic/metabolic relationship in the TRAMP prostate cancer animal model. Cancer biology & therapy 2011;12(12):1078-1084.
- de Fatima A, Kohn LK, Antonio MA, de Carvalho JE, Pilli RA. (R)-Goniothalamin: total syntheses and cytotoxic activity against cancer cell lines. Bioorganic & medicinal chemistry 2005;13(8):2927-2933.
- Vendramini-Costa DB, de Castro IB, Ruiz AL, Marquissolo C, Pilli RA, de Carvalho JE.
  Effect of goniothalamin on the development of Ehrlich solid tumor in mice. Bioorganic & medicinal chemistry 2010;18(18):6742-6747.
- 24. Sozer S, Diniz G, Lermioglu F. Effects of celecoxib in young rats: histopathological changes in tissues and alterations of oxidative stress/antioxidant defense system. Arch Pharm Res 2011;34(2):253-259.
- 25. Montico F, Kido LA, Hetzl AC, Cagnon VH. Prostatic angiogenic responses in late life: antiangiogenic therapy influences and relation with the glandular microenvironment in

the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model. The Prostate 2015;75(5):484-499.

- 26. Tomas D, Kruslin B. The potential value of (Myo)fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. The Prostate 2004;61(4):324-331.
- 27. Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 2002;8(9):2912-2923.
- Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Dang TD, Ayala GE, Rowley DR. Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. Cancer research 2002;62(11):3298-3307.
- 29. Le Belle JE, Harris NG, Williams SR, Bhakoo KK. A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution 1H-NMR spectroscopy. NMR in biomedicine 2002;15(1):37-44.
- Canevarolo R, R. Metabolômica da resistência ao metotrexato na leucemia linfóide aguda. Campinas: University of Campinas; 2012. 124 p.
- 31. Zar JH. Biostatistical Analysis. Upper Saddle River, NJ, USA: Prentice Hall Upper.; 1999.
- 32. Shi XB, Gumerlock PH, deVere White RW. Molecular biology of prostate cancer. World J Urol 1996;14(5):318-328.
- 33. Ichim G, Tait SW. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. Nature reviews Cancer 2016;16(8):539-548.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science 1997;275(5303):1132-1136.
- 35. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. Am J Pathol 2000;157(5):1415-1430.
- 36. Furuya Y, Krajewski S, Epstein JI, Reed JC, Isaacs JT. Expression of bcl-2 and the progression of human and rodent prostatic cancers. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 1996;2(2):389-398.
- 37. Pienta KJ, Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgenindependent prostate cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 2006;12(6):1665-1671.
- Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR. Bcl-2 protein expression correlates with cell survival and androgen independence in rat prostatic lobes. Endocrinology 2002;143(5):1825-1832.
- Campos SG, Goncalves BF, Scarano WR, Corradi LS, Santos FC, Custodio AM,
  Vilamaior PS, Goes RM, Taboga SR. Tissue changes in senescent gerbil prostate after

hormone deprivation leads to acquisition of androgen insensitivity. Int J Exp Pathol 2010;91(5):394-407.

- Inayat-Hussain SH, Osman AB, Din LB, Ali AM, Snowden RT, MacFarlane M, Cain K. Caspases-3 and -7 are activated in goniothalamin-induced apoptosis in human Jurkat T-cells. FEBS Lett 1999;456(3):379-383.
- 41. Inayat-Hussain SH, Chan KM, Rajab NF, Din LB, Chow SC, Kizilors A, Farzaneh F, Williams GT. Goniothalamin-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis via caspase-2 independent and Bcl-2 independent pathways in Jurkat T-cells. Toxicology letters 2010;193(1):108-114.
- Zhong L, Li CM, Hao XJ, Lou LG. Induction of leukemia cell apoptosis by cheliensisin A involves down-regulation of Bcl-2 expression. Acta Pharmacol Sin 2005;26(5):623-628.
- Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. Cancer research 1998;58(2):362-366.
- Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. Cancer research 1998;58(19):4245-4249.
- Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM, Chen CS. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. The Journal of biological chemistry 2000;275(15):11397-11403.
- 46. Gennigens C, Menetrier-Caux C, Droz JP. Insulin-Like Growth Factor (IGF) family and prostate cancer. Crit Rev Oncol Hematol 2006;58(2):124-145.
- 47. Di Popolo A, Memoli A, Apicella A, Tuccillo C, di Palma A, Ricchi P, Acquaviva AM, Zarrilli R. IGF-II/IGF-I receptor pathway up-regulates COX-2 mRNA expression and PGE2 synthesis in Caco-2 human colon carcinoma cells. Oncogene 2000;19(48):5517-5524.
- 48. Liu CH, Bao HG, Ge YL, Wang SK, Shen Y, Xu L. Celecoxib inhibits insulin-like growth factor 1 induced growth and invasion in non-small cell lung cancer. Oncol Lett 2013;5(6):1943-1947.
- 49. Weroha SJ, Haluska P. The insulin-like growth factor system in cancer. Endocrinol Metab Clin North Am 2012;41(2):335-350, vi.
- Rojas A, Liu G, Coleman I, Nelson PS, Zhang M, Dash R, Fisher PB, Plymate SR, Wu JD. IL-6 promotes prostate tumorigenesis and progression through autocrine crossactivation of IGF-IR. Oncogene 2011;30(20):2345-2355.

- Liu Y, Liu A, Li H, Li C, Lin J. Celecoxib inhibits interleukin-6/interleukin-6 receptorinduced JAK2/STAT3 phosphorylation in human hepatocellular carcinoma cells. Cancer prevention research 2011;4(8):1296-1305.
- 52. Vendramini-Costa DB, Alcaide A, Pelizzaro-Rocha KJ, Talero E, Avila-Roman J, Garcia-Maurino S, Pilli RA, de Carvalho JE, Motilva V. Goniothalamin prevents the development of chemically induced and spontaneous colitis in rodents and induces apoptosis in the HT-29 human colon tumor cell line. Toxicol Appl Pharmacol 2016;300:1-12.
- 53. Wang SC. PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target? Trends Pharmacol Sci 2014;35(4):178-186.
- 54. Teichert F, Verschoyle RD, Greaves P, Edwards RE, Teahan O, Jones DJ, Wilson ID, Farmer PB, Steward WP, Gant TW, Gescher AJ, Keun HC. Metabolic profiling of transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) tissue by 1H-NMR analysis: evidence for unusual phospholipid metabolism. The Prostate 2008;68(10):1035-1047.
- 55. Costello LC, Franklin RB, Feng P. Mitochondrial function, zinc, and intermediary metabolism relationships in normal prostate and prostate cancer. Mitochondrion 2005;5(3):143-153.
- 56. Costello LC, Franklin RB. The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. Mol Cancer 2006;5:17.
- 57. Costello LC, Franklin RB. Zinc is decreased in prostate cancer: an established relationship of prostate cancer! J Biol Inorg Chem 2011;16(1):3-8.
- 58. Swanson MG, Vigneron DB, Tabatabai ZL, Males RG, Schmitt L, Carroll PR, James JK, Hurd RE, Kurhanewicz J. Proton HR-MAS spectroscopy and quantitative pathologic analysis of MRI/3D-MRSI-targeted postsurgical prostate tissues. Magnetic resonance in medicine 2003;50(5):944-954.
- 59. Keshari KR, Tsachres H, Iman R, Delos Santos L, Tabatabai ZL, Shinohara K, Vigneron DB, Kurhanewicz J. Correlation of phospholipid metabolites with prostate cancer pathologic grade, proliferative status and surgical stage impact of tissue environment. NMR in biomedicine 2011;24(6):691-699.
- Swanson MG, Keshari KR, Tabatabai ZL, Simko JP, Shinohara K, Carroll PR, Zektzer AS, Kurhanewicz J. Quantification of choline- and ethanolamine-containing metabolites in human prostate tissues using 1H HR-MAS total correlation spectroscopy. Magnetic resonance in medicine 2008;60(1):33-40.
- 61. Moreadith RW, Lehninger AL. The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria. Role of mitochondrial NAD(P)+-dependent malic enzyme. The Journal of biological chemistry 1984;259(10):6215-6221.

62. Costello LC, Franklin RB. 'Why do tumour cells glycolyse?': from glycolysis through citrate to lipogenesis. Molecular and cellular biochemistry 2005;280(1-2):1-8.

# 8. FIGURAS E LEGENDAS

# Figura 1.



**Figura 1.** Fotomicrografias da imunomarcação de AR, STAT-3 e IGFR-1 (seta) na próstata ventral de camundongos FVB. Ep: epitélio; St: estroma; L: lúmen; nu: marcação nuclear; Cit: marcação citoplasmática (Barra 50µm)





Nível de significância indicado em relação ao grupo controle SENIL: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p< 0,001

**Figura 2.** Análise dos níveis proteicos de AR, pSTAT-3, IGFR-1, PCNA e BCL-2 nos diferentes grupos experimentais.

# Figura 3.



**Figura 3.** Índice de células em apoptose na próstata de camundongos senis e tratados com GTN e Celecoxibe. Grupo Jovem (A); Grupo Senil (B); Grupo Senil Goniotalamina (C); Grupo Senil Celecoxibe (D). (Barra 50µm)



Figura 4.

Nível de significância indicado em relação ao grupo controle SENIL: \* p<0,05

**Figura 4.** Concentração de IL-6 no plasma sanguíneo de camundongos dos diferentes grupos experimentais.

Figura 5.



**Figura 5.** Concentrações dos metabólitos avaliados no tecido prostático que foram significantemente diferentes no teste estatístico ANOVA entre os grupos SENIL FVB e TRAMP de 8 e 12 semanas de idade. (A) Citrato. (B) Alanina. (C) Fosfoetanolamina. (D)

Fosfocolina. (E) Espectro de RMN apontando os sinais dos principais compostos alterados na próstata de camundongo.

Figura 6.



**Figura 6.** Componentes principais (PC´s) obtidas na plataforma online Metaboanalyst 3.0 para as amostras da próstata de camundongos FVB senis (vermelho); TRAMP de oito semanas de idade (azul); TRAMP de 12 semanas de idade (verde).

Figura 7.



**Figura 7.** Representação da análise de PLS-DA para amostras da próstata de camundongos FVB senis; TRAMP de oito semanas de idade; TRAMP de 12 semanas de idade. No gráfico

bidimensional (A), as elipses representam os intervalos de confiança de 95% para os diferentes modelos animais: grupo senil FVB (vermelho); TRAMP de oito semanas de idade (azul); TRAMP de 12 semanas de idade (verde). Relação dos 15 metabólitos com maiores índices VIP, obtidos na construção de modelo PLS-DA para amostras da próstata dos diferentes modelos animais.





**Figura 8.** Análise das concentrações metabólicas de citrato (A), alanina (B), fosfoetanolamina (C) e fosfocolina (D) nos grupos JOVEM e SENIL. Teste t-student: não apresentou diferenças estatisticamente significativas: p>0,005.

# 9. TABELAS

**Tabela 1**. Distribuição da imunorreatividade de AR, STAT-3 e IGFR-1 na próstata ventral de animais FVB senis dos diferentes grupos experimentais.

	JOVEM		SENIL		SNGTN		SNCEL	
	Ер	St	Ер	St	Ер	St	Ер	St
AR	3	1	1	1	2	1	2	1
	Nu / Cit							
STAT-3	2/1	2/1	3/3	2/3	2/3	2/3	1/1	1/2
IGFR-1	1	2	1	3	1	1	1	1

Distribuição da imunorreatividade: 0 (0%), 1 (33%), 2 (33–66%), e 3 (66%). Ep: Epitélio; St: Estroma; Nu: Núcleo; Cit: Citoplasma

**Tabela 2.** Metabólitos considerados na análise de conteúdo intracelular das amostras do lobo ventral da próstata de camundongos senis e transgênicos para o adenocarcinoma de próstata.

METABÓLITOS INTRACELULARES					
Acetato	Galactarato				
Aconitato	Glicerofosfocolina				
Alanina	Glicina				
Citrato	Glicose				
Colina	Glutamato				
Creatina	Glutamina				
Creatina fosfato	Inosina				
Creatinina	Lactato				
Etanol	Mio-inositol				
Formato	Niacinamida				
Fosfocolina	Piruvato				
Fosfoetanolamina	Taurina				
Fumarato					

## 7. CONSIDERAÇÕES GERAIS DA TESE

- Os tratamentos com Goniotalamina e Celecoxibe apresentaram ação quimiopreventiva em ambos modelos experimentais através do controle da inflamação. No modelo TRAMP, esta ação apresentou efeito prolongado e retardou o avanço da doença, demonstrando que a progressão do câncer de próstata é diretamente influenciada pela ação de mediadores pró-inflamatórios.
- O uso do modelo TRAMP no estudo da inflamação versus câncer de próstata nos proporcionou maior entendimento acerca do microambiente prostático durante o desenvolvimento de neoplasias, e revelou a Goniotalamina como nova e promissora abordagem terapêutica na prevenção e tratamento do adenocarcinoma prostático devido ao amplo espectro de ação desse composto
- A diminuição da proliferação e aumento da apoptose ocasionada pelos tratamentos com Goniotalamina e Celecoxibe também indicaram o potencial anti-tumoral dessas duas drogas, e trouxeram resultados inéditos em relação aos efeitos da Goniotalamina *in vivo*.
- O controle da inflamação antes da instalação de lesões malignas interferiu nos mecanismos de proliferação e morte celular, se apresentando como um método alternativo na prevenção do câncer de próstata.
- Os efeitos benéficos da Goniotalamina foram superiores e ou atingiram maior espectro aos observados para o Celecoxibe na maioria dos parâmetros avaliados na próstata de camundongos senis e TRAMP.
- A resposta biológica aos tratamentos com Goniotalamina e Celecoxibe comprovou que a inflamação é elemento fundamental para iniciação e promoção do câncer de próstata.

 As alterações encontradas na próstata durante a fase de envelhecimento não se restringiram a mudanças morfológicas e proteicas, mas também foi evidente no nível metabolômico. Assim sendo, destacamos a importância dos efeitos do envelhecimento no metabolismo da próstata, indicando os elementos da metabolômica como alvo para terapias quimiopreventivas, bem como a ser utilizado como possível método complementar na detecção precoce de lesões potencialmente agressivas

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS DA TESE

Aaron L, Franco OE, Hayward SW. 2016. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. Urol Clin North Am 43:279-288.

Abate-Shen C, Shen MM. 2000. Molecular genetics of prostate cancer. Genes Dev 14:2410-2434.

Al-Qubaisi M, Rozita R, Yeap SK, Omar AR, Ali AM, Alitheen NB. 2011. Selective cytotoxicity of goniothalamin against hepatoblastoma HepG2 cells. Molecules 16:2944-2959.

Arias-Mendoza F, Smith MR, Brown TR. 2004. Predicting treatment response in non-Hodgkin's lymphoma from the pretreatment tumor content of phosphoethanolamine plus phosphocholine. Acad Radiol 11:368-376.

Arver S. 1982. Zinc and zinc ligands in human seminal plasma. III. The principal low molecular weight zinc ligand in prostatic secretion and seminal plasma. Acta Physiol Scand 116:67-73. Aumuller G, Adler G. 1979. Experimental studies of apocrine secretion in the dorsal prostate epithelium of the rat. Cell Tissue Res 198:145-158.

Aumuller G, Seitz J. 1990. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. Int Rev Cytol 121:127-231.

Balkwill F, Mantovani A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet 357:539-545.

Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR. 2002. Bcl-2 protein expression correlates with cell survival and androgen independence in rat prostatic lobes. Endocrinology 143:1825-1832.

Banerjee S, Banerjee PP, Brown TR. 2000. Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. Endocrinology 141:821-832.

Bangma CH, Roemeling S, Schroder FH. 2007. Overdiagnosis and overtreatment of early detected prostate cancer. World J Urol 25:3-9.

Bansal N, Gupta A, Mitash N, Shakya PS, Mandhani A, Mahdi AA, Sankhwar SN, Mandal SK. 2013. Low- and high-grade bladder cancer determination via human serum-based metabolomics approach. J Proteome Res 12:5839-5850. Barcelos RC, Pastre JC, Caixeta V, Vendramini-Costa DB, de Carvalho JE, Pilli RA. 2012. Synthesis of methoxylated goniothalamin, aza-goniothalamin and gamma-pyrones and their in vitro evaluation against human cancer cells. Bioorg Med Chem 20:3635-3651.

Bayley JP, Devilee P. 2012. The Warburg effect in 2012. Curr Opin Oncol 24:62-67.

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 5.

Bonkhoff H, Berges R. 2009. The evolving role of oestrogens and their receptors in the development and progression of prostate cancer. Eur Urol 55:533-542.

Bromberg J, Wang TC. 2009. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. Cancer Cell 15:79-80.

Campos SG, Goncalves BF, Scarano WR, Corradi LS, Santos FC, Custodio AM, Vilamaior PS, Goes RM, Taboga SR. 2010. Tissue changes in senescent gerbil prostate after hormone deprivation leads to acquisition of androgen insensitivity. Int J Exp Pathol 91:394-407.

Caruso C, Balistreri CR, Candore G, Carruba G, Colonna-Romano G, Di Bona D, Forte GI, Lio D, Listi F, Scola L, Vasto S. 2009. Polymorphisms of pro-inflammatory genes and prostate cancer risk: a pharmacogenomic approach. Cancer Immunol Immunother 58:1919-1933.

Canevarolo R, R. (2012) Metabolômica da resistência ao metotrexato na leucemia linfóide aguda. Campinas: University of Campinas; 2012. 1-124.

Cavazos F. 1975. Fine Structure and Functional Correlates of Male Accessory Sex Glands of Rodents. In: Handbook of Physiology. Washington: American Physiological Society. 353-381. Chiaverotti T, Couto SS, Donjacour A, Mao JH, Nagase H, Cardiff RD, Cunha GR, Balmain A. 2008. Dissociation of epithelial and neuroendocrine carcinoma lineages in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model of prostate cancer. Am J Pathol 172:236-246.

Colombel MC, Buttyan R. 1995. Hormonal control of apoptosis: the rat prostate gland as a model system. Methods Cell Biol 46:369-385.

Costello LC, Franklin RB. 1994. Effect of prolactin on the prostate. Prostate 24:162-166.

Costello LC, Franklin RB. 2006. The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. Mol Cancer 5:17.

Costello LC, Franklin RB. 2011. Zinc is decreased in prostate cancer: an established relationship of prostate cancer! J Biol Inorg Chem 16:3-8.

Costello LC, Franklin RB, Feng P. 2005. Mitochondrial function, zinc, and intermediary metabolism relationships in normal prostate and prostate cancer. Mitochondrion 5:143-153.

Costello LC, Franklin RB, Narayan P. 1999. Citrate in the diagnosis of prostate cancer. Prostate 38:237-245.

Costello LC, Franklin RB, Zou J, Feng P, Bok R, Swanson MG, Kurhanewicz J. 2011. Human prostate cancer ZIP1/zinc/citrate genetic/metabolic relationship in the TRAMP prostate cancer animal model. Cancer Biol Ther 12:1078-1084.

Coussens LM, Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. Nature 420:860-867.

Crusz SM, Balkwill FR. 2015. Inflammation and cancer: advances and new agents. Nat Rev Clin Oncol 12:584-596.

Culig Z, Puhr M. 2012. Interleukin-6: a multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer. Mol Cell Endocrinol 360:52-58.

Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ. 2002. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. Differentiation 70:473-485.

Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ, Ricke WA. 2003. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. Int J Cancer 107:1-10.

Cunha GR, Matrisian LM. 2002. It's not my fault, blame it on my microenvironment. Differentiation 70:469-472.

Cunha GR, Wang YZ, Hayward SW, Risbridger GP. 2001. Estrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. Reprod Fertil Dev 13:285-296.

Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. Nat Rev Mol Cell Biol 15:49-63.

Dal Pozzo CF, Kido LA, Montico F, Goncalves MP, Cagnon VH. 2016. Morphology and MMP-9, AR and IGFR-1 responses of the seminal vesicle in TRAMP mice model. Tissue Cell 48:217-223.

Dandekar DS, Lopez M, Carey RI, Lokeshwar BL. 2005. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib augments chemotherapeutic drug-induced apoptosis by enhancing activation of caspase-3 and -9 in prostate cancer cells. Int J Cancer 115:484-492.

de Fatima A, Modolo LV, Conegero LS, Pilli RA, Ferreira CV, Kohn LK, de Carvalho JE. 2006. Styryl lactones and their derivatives: biological activities, mechanisms of action and potential leads for drug design. Curr Med Chem 13:3371-3384.

de Fatima A, Zambuzzi WF, Modolo LV, Tarsitano CA, Gadelha FR, Hyslop S, de Carvalho JE, Salgado I, Ferreira CV, Pilli RA. 2008. Cytotoxicity of goniothalamin enantiomers in renal cancer cells: involvement of nitric oxide, apoptosis and autophagy. Chem Biol Interact 176:143-150.

De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. 1999. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. Am J Pathol 155:1985-1992.

De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. Nat Rev Cancer 7:256-269.

De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schroder F, Sciarra A, Tubaro A. 2011. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. Eur Urol 60:106-117.

Di Popolo A, Memoli A, Apicella A, Tuccillo C, di Palma A, Ricchi P, Acquaviva AM, Zarrilli R. 2000. IGF-II/IGF-I receptor pathway up-regulates COX-2 mRNA expression and PGE2 synthesis in Caco-2 human colon carcinoma cells. Oncogene 19:5517-5524.

Djavan B, Eckersberger E, Espinosa G., Kramer G, Handisurya A, Lee C, Marberger M, Lepor H, Steiner GE. 2009. Complex mechanisms in prostatic inflammatory response. European Urology Supplements 8:872-878.

Djavan B, Waldert M, Seitz C, Marberger M. 2001. Insulin-like growth factors and prostate cancer. World J Urol 19:225-233.
Droller MJ. 1997. Medical approaches in the management of prostatic disease. Br J Urol 79 Suppl 2:42-52.

Ekman P. 2000. The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. Prostate Suppl 10:14-18.

Ellem SJ, Risbridger GP. 2010. Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. J Steroid Biochem Mol Biol 118:246-251.

Ellem SJ, Wang H, Poutanen M, Risbridger GP. 2009. Increased endogenous estrogen synthesis leads to the sequential induction of prostatic inflammation (prostatitis) and prostatic pre-malignancy. Am J Pathol 175:1187-1199.

Fiehn O. 2002. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. Plant Mol Biol 48:155-171.

Frick J, Aulitzky W. 1991. Physiology of the prostate. Infection 19:S115-118.

Furuya Y, Krajewski S, Epstein JI, Reed JC, Isaacs JT. 1996. Expression of bcl-2 and the progression of human and rodent prostatic cancers. Clin Cancer Res 2:389-398.

Garcia Rodriguez LA, Gonzalez-Perez A. 2004. Inverse association between nonsteroidal antiinflammatory drugs and prostate cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 13:649-653.

Garraway LA, Lin D, Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Bhattacharya N, Loda M. 2003. Intermediate basal cells of the prostate: in vitro and in vivo characterization. Prostate 55:206-218.

Gennigens C, Menetrier-Caux C, Droz JP. 2006. Insulin-Like Growth Factor (IGF) family and prostate cancer. Crit Rev Oncol Hematol 58:124-145.

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. Gravitz L. 2011. Chemoprevention: First line of defence. Nature 471:S5-7.

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 U S A 92:3439-3443.

Griffiths JR, Cady E, Edwards RH, McCready VR, Wilkie DR, Wiltshaw E. 1983. 31P-NMR studies of a human tumour in situ. Lancet 1:1435-1436.

Gupta A, Gupta S, Mahdi AA. 2015. (1)H NMR-derived serum metabolomics of leukoplakia and squamous cell carcinoma. Clin Chim Acta 441:47-55.

Hamid AR, Umbas R, Mochtar CA. 2011. Recent role of inflammation in prostate diseases: chemoprevention development opportunity. Acta Med Indones 43:59-65.

Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR, Baltimore Longitudinal Study of A. 2001. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. J Clin Endocrinol Metab 86:724-731.

Hayward SW, Cunha GR. 2000. The prostate: development and physiology. Radiol Clin North Am 38:1-14.

He G, Karin M. 2011. NF-kappaB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. Cell Res 21:159-168.

Heidegger I, Massoner P, Sampson N, Klocker H. 2015. The insulin-like growth factor (IGF) axis as an anticancer target in prostate cancer. Cancer Lett 367:113-121.

Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. 2005. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. Eur J Cancer 41:2502-2512.

Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM, Chen CS. 2000. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. J Biol Chem 275:11397-11403.

Huss WJ, Barrios RJ, Foster BA, Greenberg NM. 2003a. Differential expression of specific FGF ligand and receptor isoforms during angiogenesis associated with prostate cancer progression. Prostate 54:8-16.

Huss WJ, Barrios RJ, Greenberg NM. 2003b. SU5416 selectively impairs angiogenesis to induce prostate cancer-specific apoptosis. Mol Cancer Ther 2:611-616.

Huss WJ, Maddison LA, Greenberg NM. 2001. Autochthonous mouse models for prostate cancer: past, present and future. Semin Cancer Biol 11:245-260.

Ichim G, Tait SW. 2016. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. Nat Rev Cancer 16:539-548.

Inayat-Hussain SH, Chan KM, Rajab NF, Din LB, Chow SC, Kizilors A, Farzaneh F, Williams GT. 2010. Goniothalamin-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis via caspase-2 independent and Bcl-2 independent pathways in Jurkat T-cells. Toxicol Lett 193:108-114. Inayat-Hussain SH, Osman AB, Din LB, Ali AM, Snowden RT, MacFarlane M, Cain K. 1999. Caspases-3 and -7 are activated in goniothalamin-induced apoptosis in human Jurkat T-cells. FEBS Lett 456:379-383.

INCA. 2015. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da SIlva In. Rio de Janeiro. p 31-32.

Innajak S, Mahabusrakum W, Watanapokasin R. 2016. Goniothalamin induces apoptosis associated with autophagy activation through MAPK signaling in SK-BR-3 cells. Oncol Rep 35:2851-2858.

Isayeva T, Chanda D, Kallman L, Eltoum IE, Ponnazhagan S. 2007. Effects of sustained antiangiogenic therapy in multistage prostate cancer in TRAMP model. Cancer Res 67:5789-5797.

Jendrossek V. 2013. Targeting apoptosis pathways by Celecoxib in cancer. Cancer Lett 332:313-324.

Jesik CJ, Holland JM, Lee C. 1982. An anatomic and histologic study of the rat prostate. Prostate 3:81-97.

Jia YL, Liu X, Yan JY, Chong LM, Li L, Ma AC, Zhou L, Sun ZY. 2015. The alteration of inflammatory markers and apoptosis on chronic prostatitis induced by estrogen and androgen. Int Urol Nephrol 47:39-46.

Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. Histochem J 11:447-455.

Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. 2003. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. Rev Physiol Biochem Pharmacol 149:1-38.

Kelly RS, Vander Heiden MG, Giovannucci E, Mucci LA. 2016. Metabolomic Biomarkers of Prostate Cancer: Prediction, Diagnosis, Progression, Prognosis, and Recurrence. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 25:887-906.

Keshari KR, Tsachres H, Iman R, Delos Santos L, Tabatabai ZL, Shinohara K, Vigneron DB, Kurhanewicz J. 2011. Correlation of phospholipid metabolites with prostate cancer pathologic grade, proliferative status and surgical stage - impact of tissue environment. NMR Biomed 24:691-699.

Kido LA, Hetzl AC, Cândido EM, Montico F, Lorencini RM, Cagnon VH. 2014. Antiangiogenic and finasteride therapies: responses of the prostate microenvironment in elderly mice. Life Sci 106:58-70.

Kido LA, Montico F, Sauce R, Macedo AB, Minatel E, Costa DB, Carvalho JE, Pilli RA, Cagnon VH. 2016. Anti-inflammatory therapies in TRAMP mice: delay in PCa progression. Endocr Relat Cancer 23:235-250.

Kismet K, Akay MT, Abbasoglu O, Ercan A. 2004. Celecoxib: a potent cyclooxygenase-2 inhibitor in cancer prevention. Cancer Detect Prev 28:127-142.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science 275:1132-1136.

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.

Kumar D, Gupta A, Mandhani A, Sankhwar SN. 2015. Metabolomics-derived prostate cancer biomarkers: fact or fiction? J Proteome Res 14:1455-1464.

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.

Lavecchia A, Di Giovanni C, Novellino E. 2011. STAT-3 inhibitors: state of the art and new horizons for cancer treatment. Curr Med Chem 18:2359-2375.

Levy DE, Lee CK. 2002. What does Stat3 do? J Clin Invest 109:1143-1148.

Liu CH, Bao HG, Ge YL, Wang SK, Shen Y, Xu L. 2013. Celecoxib inhibits insulin-like growth factor 1 induced growth and invasion in non-small cell lung cancer. Oncol Lett 5:1943-1947.

Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. 1998. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. Cancer Res 58:4245-4249.

Liu Y, Costello LC, Franklin RB. 1996. Prolactin specifically regulates citrate oxidation and maconitase of rat prostate epithelial cells. Metabolism 45:442-449.

Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. Dev Biol 253:165-174.

McNeal JE. 1988. Normal histology of the prostate. Am J Surg Pathol 12:619-633.

Mechergui YB, Ben Jemaa A, Mezigh C, Fraile B, Ben Rais N, Paniagua R, Royuela M, Oueslati R. 2009. The profile of prostate epithelial cytokines and its impact on sera prostate specific antigen levels. Inflammation 32:202-210.

Montico F, Favaro WJ, Candido EM, Martinez M, Pinheiro PF, Martinez FE, Cagnon VH. 2010. Alcoholism and coagulating gland: androgen and insulin like growth factor-1 receptor features. Tissue Cell 42:203-210.

Montico F, Kido LA, Hetzl AC, Lorencini RM, Candido EM, Cagnon VH. 2014. Antiangiogenic therapy effects on age-associated matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and insulin-like growth factor receptor-1 (IGFR-1) responses: a comparative study of prostate disorders in aged and TRAMP mice. Histochem Cell Biol 142:269-284.

Narayanan BA, Condon MS, Bosland MC, Narayanan NK, Reddy BS. 2003. Suppression of N-methyl-N-nitrosourea/testosterone-induced rat prostate cancer growth by celecoxib: effects on cyclooxygenase-2, cell cycle regulation, and apoptosis mechanism(s). Clin Cancer Res 9:3503-3513.

Narayanan NK, Nargi D, Horton L, Reddy BS, Bosland MC, Narayanan BA. 2009. Inflammatory processes of prostate tissue microenvironment drive rat prostate carcinogenesis: preventive effects of celecoxib. Prostate 69:133-141.

Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. 2003. Prostate cancer. N Engl J Med 349:366-381. Nicholson JK, Lindon JC. 2008. Systems biology: Metabonomics. Nature 455:1054-1056. Oliveira DS, Dzinic S, Bonfil AI, Saliganan AD, Sheng S, Bonfil RD. 2016. The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. Bosn J Basic Med Sci 16:8-13.

Owen DH, Katz DF. 2005. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. J Androl 26:459-469.

Pal RP, Maitra NU, Mellon JK, Khan MA. 2013. Defining prostate cancer risk before prostate biopsy. Urol Oncol 31:1408-1418.

Pan T, Gao L, Wu G, Shen G, Xie S, Wen H, Yang J, Zhou Y, Tu Z, Qian W. 2015. Elevated expression of glutaminase confers glucose utilization via glutaminolysis in prostate cancer. Biochem Biophys Res Commun 456:452-458.

Patel MI, Subbaramaiah K, Du B, Chang M, Yang P, Newman RA, Cordon-Cardo C, Thaler HT, Dannenberg AJ. 2005. Celecoxib inhibits prostate cancer growth: evidence of a cyclooxygenase-2-independent mechanism. Clin Cancer Res 11:1999-2007.

Pienta KJ, Bradley D. 2006. Mechanisms underlying the development of androgenindependent prostate cancer. Clin Cancer Res 12:1665-1671.

Raina K, Serkova NJ, Agarwal R. 2009. Silibinin feeding alters the metabolic profile in TRAMP prostatic tumors: 1H-NMRS-based metabolomics study. Cancer Res 69:3731-3735.

Reed JC. 2000. Mechanisms of apoptosis. Am J Pathol 157:1415-1430.

Roberts MJ, Schirra, H., Lavin, M. F., Gardiner, R. A. 2014. Nmr-Based Metabolomics: Global Analysis Of Metabolites To Address Problems In Prostate Cancer. In: Cervical, Breast And Prostate Cancer Hong Kong: Inconcept Press. p 1-43.

Rojas A, Liu G, Coleman I, Nelson PS, Zhang M, Dash R, Fisher PB, Plymate SR, Wu JD. 2011. IL-6 promotes prostate tumorigenesis and progression through autocrine cross-activation of IGF-IR. Oncogene 30:2345-2355.

Rollins BJ. 2006. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. Eur J Cancer 42:760-767.

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.

Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. 2008. Activation of innate immunity system during aging: NF-kB signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. Ageing Res Rev 7:83-105.

Sam TW, Sew-Yeu C, Matsjeh S, Gan EK, Razak D, Mohamedb AL. 1987. Goniothalamin oxide: An embryotoxic compound from Goniothalamus macrophyllus (annonaceae). Tetrahedron Letters 28:2541-2544.

Sciarra A, Mariotti G, Salciccia S, Autran Gomez A, Monti S, Toscano V, Di Silverio F. 2008. Prostate growth and inflammation. J Steroid Biochem Mol Biol 108:254-260.

Setchell BP, Brooks PE. 1988. Anatomy, Vasculature, Innervations And Fluids Of The Male Reproductive Tract. In: The Physiology Of Reproduction. New York. p 753-836.

Sfanos KS, De Marzo AM. 2012. Prostate cancer and inflammation: the evidence. Histopathology 60:199-215.

Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. 1998. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. Cancer Res 58:362-366. Shi XB, Gumerlock PH, deVere White RW. 1996. Molecular biology of prostate cancer. World J Urol 14:318-328.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2015. Cancer statistics, 2015. CA Cancer J Clin 65:5-29. Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. 2010. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. Int J Cell Biol 2010:215158. Sozer S, Diniz G, Lermioglu F. 2011. Effects of celecoxib in young rats: histopathological changes in tissues and alterations of oxidative stress/antioxidant defense system. Arch Pharm Res 34:253-259.

Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, Laxman B, Mehra R, Lonigro RJ, Li Y, Nyati MK, Ahsan A, Kalyana-Sundaram S, Han B, Cao X, Byun J, Omenn GS, Ghosh D, Pennathur S, Alexander DC, Berger A, Shuster JR, Wei JT, Varambally S, Beecher C, Chinnaiyan AM. 2009. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. Nature 457:910-914. Srinivasan G, Campbell E, Bashirelahi N. 1995. Androgen, estrogen, and progesterone receptors in normal and aging prostates. Microsc Res Tech 30:293-304.

Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA. 1986. Morphological and histological study of castration-induced degeneration and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. Biol Reprod 34:973-983.

Swanson MG, Vigneron DB, Tabatabai ZL, Males RG, Schmitt L, Carroll PR, James JK, Hurd RE, Kurhanewicz J. 2003. Proton HR-MAS spectroscopy and quantitative pathologic analysis of MRI/3D-MRSI-targeted postsurgical prostate tissues. Magn Reson Med 50:944-954.

Taylor RA, Cowin P, Couse JF, Korach KS, Risbridger GP. 2006. 17beta-estradiol induces apoptosis in the developing rodent prostate independently of ERalpha or ERbeta. Endocrinology 147:191-200.

Teichert F, Verschoyle RD, Greaves P, Edwards RE, Teahan O, Jones DJ, Wilson ID, Farmer PB, Steward WP, Gant TW, Gescher AJ, Keun HC. 2008. Metabolic profiling of transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) tissue by 1H-NMR analysis: evidence for unusual phospholipid metabolism. Prostate 68:1035-1047.

Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA, Jr. 2004. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. N Engl J Med 350:2239-2246.

Thysell E, Surowiec I, Hornberg E, Crnalic S, Widmark A, Johansson AI, Stattin P, Bergh A, Moritz T, Antti H, Wikstrom P. 2010. Metabolomic characterization of human prostate cancer bone metastases reveals increased levels of cholesterol. PLoS One 5:e14175.

Tilstra JS, Clauson CL, Niedernhofer LJ, Robbins PD. 2011. NF-kappaB in Aging and Disease. Aging Dis 2:449-465.

Tomas D, Kruslin B. 2004. The potential value of (Myo)fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. Prostate 61:324-331.

Travis RC, Appleby PN, Martin RM, Holly JM, Albanes D, Black A, Bueno-de-Mesquita HB, Chan JM, Chen C, Chirlaque MD, Cook MB, Deschasaux M, Donovan JL, Ferrucci L, Galan P, Giles GG, Giovannucci EL, Gunter MJ, Habel LA, Hamdy FC, Helzlsouer KJ, Hercberg S, Hoover RN, Janssen JA, Kaaks R, Kubo T, Le Marchand L, Metter EJ, Mikami K, Morris JK, Neal DE, Neuhouser ML, Ozasa K, Palli D, Platz EA, Pollak MN, Price AJ, Roobol MJ, Schaefer C, Schenk JM, Severi G, Stampfer MJ, Stattin P, Tamakoshi A, Tangen CM, Touvier M, Wald NJ, Weiss NS, Ziegler RG, Key TJ, Allen NE, Endogenous Hormones NB, Prostate Cancer Collaborative G. 2016. A Meta-analysis of Individual Participant Data Reveals an Association between Circulating Levels of IGF-I and Prostate Cancer Risk. Cancer Res 76:2288-2300.

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. 2002a. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. Clin Cancer Res 8:2912-2923.

Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Dang TD, Ayala GE, Rowley DR. 2002b. Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. Cancer Res 62:3298-3307.

Twum-Ampofo J, Fu DX, Passaniti A, Hussain A, Siddiqui MM. 2016. Metabolic targets for potential prostate cancer therapeutics. Curr Opin Oncol 28:241-247.

Untergasser G, Madersbacher S, Berger P. 2005. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. Exp Gerontol 40:121-128.

Vendramini-Costa DB, Alcaide A, Pelizzaro-Rocha KJ, Talero E, Avila-Roman J, Garcia-Maurino S, Pilli RA, de Carvalho JE, Motilva V. 2016. Goniothalamin prevents the development of chemically induced and spontaneous colitis in rodents and induces apoptosis in the HT-29 human colon tumor cell line. Toxicol Appl Pharmacol 300:1-12.

Vendramini-Costa DB, de Castro IB, Ruiz AL, Marquissolo C, Pilli RA, de Carvalho JE. 2010. Effect of goniothalamin on the development of Ehrlich solid tumor in mice. Bioorg Med Chem 18:6742-6747. Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. 2005. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. Trends Biochem Sci 30:43-52.

Voltaggio L, Cimino-Mathews A, Bishop JA, Argani P, Cuda JD, Epstein JI, Hruban RH, Netto GJ, Stoler MH, Taube JM, Vang R, Westra WH, Montgomery EA. 2016. Current concepts in the diagnosis and pathobiology of intraepithelial neoplasia: A review by organ system. CA Cancer J Clin 66:408-436.

Wang SC. 2014. PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target? Trends Pharmacol Sci 35:178-186.

Wang W, Bergh A, Damber JE. 2004. Chronic inflammation in benign prostate hyperplasia is associated with focal upregulation of cyclooxygenase-2, Bcl-2, and cell proliferation in the glandular epithelium. Prostate 61:60-72.

Weihua Z, Makela S, Andersson LC, Salmi S, Saji S, Webster JI, Jensen EV, Nilsson S, Warner M, Gustafsson JA. 2001. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. Proc Natl Acad Sci U S A 98:6330-6335.

Weroha SJ, Haluska P. 2012. The insulin-like growth factor system in cancer. Endocrinol Metab Clin North Am 41:335-350, vi.

Wishart DS, Knox C, Guo AC, Eisner R, Young N, Gautam B, Hau DD, Psychogios N, Dong E, Bouatra S, Mandal R, Sinelnikov I, Xia J, Jia L, Cruz JA, Lim E, Sobsey CA, Shrivastava S, Huang P, Liu P, Fang L, Peng J, Fradette R, Cheng D, Tzur D, Clements M, Lewis A, De Souza A, Zuniga A, Dawe M, Xiong Y, Clive D, Greiner R, Nazyrova A, Shaykhutdinov R, Li L, Vogel HJ, Forsythe I. 2009. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. Nucleic Acids Res 37:D603-610.

Wong CP, Bray TM, Ho E. 2009. Induction of proinflammatory response in prostate cancer epithelial cells by activated macrophages. Cancer Lett 276:38-46.

Yoshimura R, Sano H, Masuda C, Kawamura M, Tsubouchi Y, Chargui J, Yoshimura N, Hla T, Wada S. 2000. Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma. Cancer 89:589-596. Zadra G, Photopoulos C, Loda M. 2013. The fat side of prostate cancer. Biochim Biophys Acta 1831:1518-1532. Zhong L, Li CM, Hao XJ, Lou LG. 2005. Induction of leukemia cell apoptosis by cheliensisin A involves down-regulation of Bcl-2 expression. Acta Pharmacol Sin 26:623-628.

## 9. APÊNDICES

## 9.1. ANÁLISE DE PESO CORPÓREO

Os dados de peso corpóreo foram obtidos no início e no fim dos diferentes tratamentos experimentais. Tanto os animais senis tratados com GTN e Celecoxibe quanto camundongos TRAMP eutanaziados com 12 e 22 semanas de idade não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparado aos seus respectivos grupos controles (Figura 1).





## 9.2. MACROSCOPIA TUMORAL

A avaliação macroscópica de incidência tumoral foi determinada no momento da eutanásia ao constatar-se aumento característico da massa tumoral, conforme a Figura 2. Os grupos TRAMP com 22 semanas de idade apresentaram visível aumento da próstata e do aporte sanguíneo, sendo a incidência de 38,4 % no grupo T2GTN e 55,5% no grupo T2CEL. Ainda, o peso tumoral foi comparado entre os grupos T2GTN e T2CEL, e apesar de não ser constado diferença significativa, os tumores encontrados no grupo T2CEL foram maiores (Figura 3).



**Figura 2.** Vista ventral geral do complexo urogenital de camundongos tramp. A: tramp de 8 semanas de idade. B: tramp de 22 semanas de idade; destaque para formação da massa tumoral (seta).





# 9.3. ÍNDICE DE MORTALIDADE

O índice de mortalidade do T2CEL foi de 30,7%, enquanto que nos demais grupos experimentais não houve incidência de mortes.

## 9.4. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DA GONIOTALAMINA

O teste de toxicidade do composto GTN foi realizado nos camundongos FVB jovens e senis, bem como nos camundongos TRAMP. Os animais foram tratados diariamente via intraperitoneal com a dose de 150mg/Kg de Goniotalamina racêmica. Sinais de toxicidade geral como efeitos na locomoção, comportamento (agitação, sonolência, atividade reduzida), respiração, salivação lacrimejamento, cianose das extremidades e mortalidade foram observados por 4 horas após aplicação no período de 15 dias. (Lintchfield & Wilcoxon, 1949; Lapa et al. 2008). A GTN não apresentou indícios de toxicidade na dose sugerida de 150mg/Kg, considerando os padrões comportamentais.





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

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "<u>A controvertida relação entre lesões</u> prostáticas e inflamação: tratamentos com Celecoxibe e Goniotalamina em camundongos senis (FVB) e portadores do gene para o adenocarcinoma prostático" (protocolo nº <u>3119-1</u>), sob a responsabilidade de <u>Profa. Dra. Valéria</u> <u>Helena Alves Cagnon Quitete / Larissa Akemi Kido</u>, 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 23 de agosto de 2013.

Amal

Profa. Dra. Aría Maria A. Guaraldo Presidente

Campinas, 23 de agosto de 2013.

THA

Fátima Alonso Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/





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

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado <u>A controvertida relação</u> <u>entre lesões prostáticas e inflamação: tratamentos com Celecoxibe e</u> <u>Goniotalamina em camundongos senis (FVB) e portadores do gene para o</u> <u>adenocarcinoma prostático</u> (protocolo CEUA/UNICAMP nº <u>3119-1</u>), de responsabilidade da <u>Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete</u> e <u>Larissa Akemi Kido</u>, tive o título alterado para <u>Inflamação e lesões neoplásicas</u> <u>na próstata: tratamentos quimiopreventivos com Goniotalamina e</u> <u>Celecoxibe em camundongos senis e transgênicos para adenocarcinoma de</u> <u>próstata (TRAMP)</u>, tendo em vista uma descrição mais objetiva dos temas abordados na tese de doutorado da pós-graduanda.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com os certificados emitidos originalmente pela CEUA/UNICAMP, sendo emitido em 23/08/2013.

Campinas, 25 de outubro de 2016.

ind

Profa. Dra. Liana M. C. Verinaud Presidente

P

Fátima Alonso Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/

#### Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada INFLAMAÇÃO E LESÕES NEOPLÁSICAS NA PRÓSTATA: TRATAMENTOS QUIMIOPREVENTIVOS COM GONIOTALAMINA E CELECOXIBE EM CAMUNDONGOS SENIS E TRANSGÊNICOS PARA O ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA (TRAMP), não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 19 de abril de 2017

Assinatura : \_

Assinatura : Nome do(a) autor(a): Larissa Akemi Kido de Barros RG n.° 33 365 226-5

Nome do(a) orientador(a): Valéria Helena Alves Cagnon Quitete RG n.º 16 793 069-2