



## Terapia com Tempol no adenocarcinoma de próstata: processo proliferativo e desequilíbrio hormonal

**Palavras-Chave: CÂNCER DE PRÓSTATA, TEMPOL, ADENOCARCINOMA**

**Autores(as):**

**KAMILA HADASSA GEREMIAS<sup>1</sup>; FELIPE RABELO SANTOS<sup>1</sup>; ISABELA MARIA URR  
ROSSETTO<sup>1</sup>; FABIO MONTICO<sup>1</sup>; VALÉRIA HELENA ALVES CAGNON QUITETE<sup>1</sup> (orientadora)**

**<sup>1</sup>Departamento de Biologia Estrutural e Funcional – Instituto de Biologia UNICAMP**

### **INTRODUÇÃO:**

O câncer de próstata (CaP) é o segundo tipo de câncer com maior incidência entre pessoas com próstata no mundo (GLOBOCAN, 2020). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), aproximadamente 65.840 novos casos e 15.983 óbitos no Brasil ocorreram em 2020, sendo considerado um problema de saúde pública (INCA, 2022).

A próstata é uma glândula sexual acessória do sistema reprodutor masculino, fundamental no processo reprodutivo. Essa, é uma das glândulas responsáveis por secretar o líquido seminal que tem como função nutrir e propiciar um meio fluído para a motilidade dos espermatozoides (Untergasser et al., 2005). Em roedores, a próstata apresenta três pares de lobos: ventral, lateral e dorsal, localizados ao redor da uretra prostática, e um par de glândulas coaguladoras ou próstata anterior localizadas na face côncava das vesículas seminais (Oliveira et al., 2016).

A terapia mais utilizada para o tratamento do CaP é a ablação androgênica de testosterona e DHT ou o bloqueio de suas ações. Porém, em algumas situações, os receptores androgênicos (AR) acabam sustentando o crescimento e a proliferação de células cancerosas, mesmo na ausência de andrógenos, atuando em diferentes caminhos biológicos, levando à ineficiência da terapia de ablação androgênica. Tal fato, poderá levar a progressão do câncer a um estágio em que ele se torna resistente à castração, ou seja, privação hormonal (Tan et al., 2015).

Ainda, é conhecido que o desequilíbrio dos hormônios sexuais, como o aumento de estrógenos e diminuição dos níveis de testosterona, como na senescência ou exposição a produtos endócrinos, pode colaborar para o desenvolvimento de inflamação, hiperplasia ou câncer de próstata (Nakamura et al., 2020). Ainda, o IGF é expresso em todo o organismo e tem funções importantes no ciclo celular, respiração anaeróbica e envelhecimento. Altos níveis e desequilíbrio da sinalização do IGF-IR dos ligantes IGF-I,

IGF-II e insulina podem estar relacionados ao aumento da esteroidogênese, proliferação celular, invasão das células do câncer de próstata e tumorigênese (Heidegger et al., 2015).

Isto posto, o uso de um fármaco coadjuvante às terapias já conhecidas no tratamento do CaP vem sendo amplamente investigado. Assim, o Tempol, pertencente à família dos nitróxidos e miméticos SOD vem sendo utilizado em estudos indicando como os níveis das defesas antioxidantes naturais celulares podem ser expandidos, já que esse vem se mostrando promissor em modelos *in vivo* em diversas doenças neoplásicas e não neoplásicas em que o estresse oxidativo está implicado na progressão da doença (Thomas and Sharifi, 2012; Rossetto et al., 2023).

## **OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral do presente estudo foi caracterizar a histopatologia, os níveis proteicos dos receptores androgênicos e estrogênicos (ER $\alpha$ ) e IGF-R (insulin-like growth fator) nos lobos anteriores da próstata de camundongos TRAMP frente ao tratamento com Tempol por um período curto e um prolongado.

## **METODOLOGIA:**

### **Análises *in vivo*: Animais e procedimentos experimentais**

No presente estudo foram utilizados 40 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). Os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional (Área de Anatomia) do Instituto de Biologia até atingirem a idade experimental para cada tratamento.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, sendo 14 animais em cada grupo:

**Grupo Controle sem TEMPOL 1 - CLT1 (8-12 semanas):** 10 camundongos TRAMP com 8 semanas de idade que receberam gavagem de água potável (veículo de diluição do Tempol/mesmo volume), ração padrão para camundongos e água *ad libitum* até a 12<sup>a</sup> semana.

**Grupo Controle sem TEMPOL 2 – CLT2 (8-16 semanas):** 10 camundongos TRAMP com 8 semanas de idade que receberam gavagem de água potável (veículo de diluição do Tempol), ração padrão para camundongos e água *ad libitum* até a 16<sup>a</sup> semana.

**Grupo Tratado com TEMPOL 1 TPL1 (8-12 semanas):** 10 camundongos TRAMP com 8 semanas de idade que receberam gavagem de Tempol (50 mg/Kg) diluído em água potável, cinco vezes por semana (uma dose diária), ração padrão para camundongos e água *ad libitum* até a 12<sup>a</sup> semana.

**Grupo Tratado com TEMPOL 2 TPL2(8-16 semanas):** 10 camundongos TRAMP com 8 semanas de idade que receberam gavagem de Tempol (50 mg/Kg) diluído em água potável, cinco vezes por semana (uma dose diária), ração padrão para camundongos e água *ad libitum* até a 16<sup>a</sup> semana.

Os animais foram tratados com Tempol (4-Hidroxi-TEMPO, 97%, *Sigma-Aldrich* - 176141) na dose de 50mg/Kg. Após as 4 ou 8 semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados. O experimento foi realizado de acordo com o estabelecido para uso de animais experimentais pelo comitê de ética (CEUA: 5503-1/2020, 5503-1(A)/2021 e 6024-1/2022). Os lobos anteriores da próstata foram coletados e processados para as análises histopatológicas, imunohistoquímica e de Western Blotting das moléculas de AR, IGFR-IR e ER $\alpha$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados mostraram aumento da porcentagem do epitélio saudável, particularmente nos animais de 8-16 semanas, e diminuição da lesão de neoplasia intraepitelial prostática de alto grau nos animais de 8-16 semanas tratados com Tempol. Ainda, no grupo de 8-12 semanas, verificou-se aumento significativo da neoplasia de baixo grau.

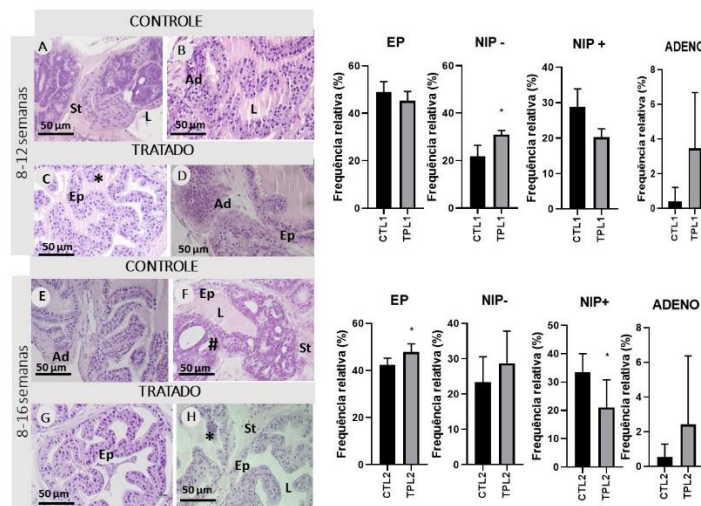


Figura 1. Fotomicrografias do lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP. Grupo CTL1 (A e C); grupo TPL1 (B e D); grupo CTL2 (E e G); grupo TPL2 (F e H). Lúmen (L); Estroma (St); Epitélio saudável (Ep); Neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau (\*), Neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (#); Adenocarcinoma (Ad). Hematoxilina-Eosina (fotos A, B, C, D, E, F, G e H). Aumento: 400X. \* p<0,05.

A análise de imunohistoquímica da molécula de PCNA não indicou diferença significativa em nenhum dos grupos experimentais.

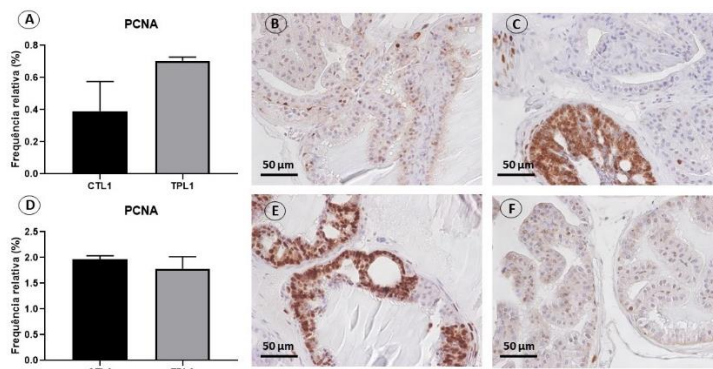


Figura 2. Gráfico da análise quantitativa e qualitativa da imunohistoquímica de PCNA e fotomicrografias da imunomarcação positiva do PCNA do lobo anterior da próstata de camundongo TRAMP dos diferentes grupos experimentais.

Já em relação às análises dos níveis proteicos no grupo TPL1, notou-se diminuição significativa dos níveis proteicos de AR em relação ao seu controle, e no grupo TPL2 não houve diferença significativa. A molécula de ER $\alpha$  não apresentou diferença significativa nos níveis proteicos em nenhum dos grupos experimentais. aumento significativo dos níveis proteicos do IGFR-IR foi verificado apenas no tratamento prologado, pois no grupo de 8-12 semanas não houve diferença significativa em relação ao seu respectivo controle.

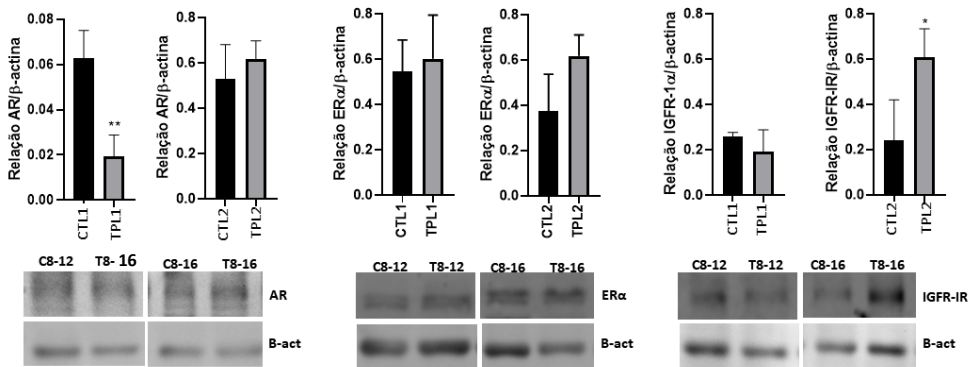


Figura 3. Gráficos da análise quantitativa dos níveis proteicos e bandas representativas de Western Blotting das moléculas AR, ER $\alpha$  e IGFR-IR para o lobo anterior da próstata de camundongos TRAMP dos diferentes grupos experimentais, tratamento (\*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ ).

Os dados apresentados sugerem que o Tempol foi efetivo em atrasar a evolução do CaP. A observação do aumento da neoplasia de baixo grau no grupo TPL1 sugere resposta positiva ao tratamento, uma vez que as células tumorais de baixo grau têm menor potencial de agressividade e disseminação. Contudo, é importante considerar se esse efeito seria mantido ao longo do tempo ou se ocorreriam mudanças após tratamentos prolongados. O resultado da diminuição da neoplasia de alto grau e do epitélio saudável em animais de tratamento prolongado levanta a hipótese de um possível efeito de estabilização ou regressão do câncer após o tratamento prolongado com o Tempol.

A baixa porcentagem observada de proliferação pode levantar a hipótese de que o estágio de avaliação no lobo anterior pode ter influenciado os resultados. A análise em um estágio mais avançado do câncer poderia revelar diferenças significativas na proliferação celular após o tratamento com Tempol. Portanto, é importante considerar se os resultados seriam consistentes em estágios mais avançados da doença.

O fato dos níveis proteicos do IGFR-IR terem aumentado no grupo TPL2 sugere que o Tempol alterou de forma desfavorável ao atraso do câncer, uma vez que a molécula de IGFR-IR está associada à proliferação celular e invasão das células do câncer de próstata.

Sendo assim, a histopatologia reflete um cenário posterior ao do cenário molecular, o que significa que as alterações moleculares podem levar algum tempo para se manifestarem clinicamente. Talvez a ausência

de diferença significativa observada na proliferação celular possa ser explicada pela natureza temporal dos efeitos moleculares do Tempol. A análise de animais em um período tardio poderia revelar como as mudanças no cenário molecular refletem na morfologia e na evolução do CaP.

## CONCLUSÕES:

Os resultados indicam que o Tempol demonstrou eficácia em retardar a evolução do Câncer de Próstata (CaP) somente no período curto de tratamento. Sendo assim, é fundamental explorar os efeitos do Tempol em tratamentos prolongados e em estágios mais avançados da doença para alcançar uma análise de forma mais abrangente para a compreensão da eficácia terapêutica desse fármaco.

## BIBLIOGRAFIA

- GLOBOCAN. **Estimated number of new cases in 2020**. 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie>. Acesso em: 25 abr. 2022.
- Heidegger I, Massoner P, Sampson N, Klocker H. **The insulin-like growth factor (IGF) axis as an anticancer target in prostate cancer**. *Cancer Lett*. 2015 Oct 28;367(2):113-21. doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.026. Epub 2015 Jul 29. PMID: 26231734.
- INCA. **Estatísticas de câncer**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 01 abr. 2022.
- Nakamura, N., Davis, K., Yan, J., Sloper, D.T. and Chen, T. (2020), **Increased Estrogen Levels Altered MicroRNA Expression in Prostate and Plasma of Rats Dosed with Sex Hormones**. *Andrologia*. Accepted Author Manuscript. doi:10.1111/andr.12780
- Oliveira DS, Dzinic S, Bonfil AI, Saliganan AD, Sheng S, Bonfil RD. **The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline**. *Bosn J Basic Med Sci*. 2016 Feb 10;16(1):8-13. doi: 10.17305/bjbms.2016.917. PMID: 26773172; PMCID: PMC4765945.
- Rossetto I, Santos F, Kido L, Lamas C, Montico F, Cagnon V. **Tempol differential effect on prostate cancer inflammation: In vitro and in vivo evaluation**. *Prostate*. 2023 Apr;83(5):403-415. doi: 10.1002/pros.24473. Epub 2022 Dec 22. PMID: 36546327.
- Tan MH, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. **Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery**. *Acta Pharmacol Sin*. 2015 Jan;36(1):3-23. doi: 10.1038/aps.2014.18. Epub 2014 Jun 9. PMID: 24909511; PMCID: PMC4571323.
- Thomas R, Sharifi N. **SOD mimetics: a novel class of androgen receptor inhibitors that suppresses castration-resistant growth of prostate cancer**. *Mol Cancer Ther*. 2012 Jan;11(1):87-97. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0540. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22172488; PMCID: PMC3256291.
- Untergasser G, Madersbacher S, Berger P. **Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling**. *Exp Gerontol*. 2005 Mar;40(3):121-8. doi: 10.1016/j.exger.2004.12.008. Epub 2005 Jan 22. PMID: 15763388.