



RESPOSTAS DO ESTROMA PROSTÁTICO ASSOCIADO À SENESCÊNCIA FRENTE A TERAPIAS DE INIBIÇÃO DA INFLAMAÇÃO E DA ANGIOGÊNESE

Palavras-Chave: PRÓSTATA, SENESCÊNCIA, ESTROMA

Autores(as):

VITÓRIA PEREIRA DOS SANTOS, IB – UNICAMP

FABIANA REGINA SCHIEVANO, IB – UNICAMP

Profa. Dra. VALÉRIA HELENA ALVES CAGNON, IB – UNICAMP

Prof. Dr. FABIO MONTICO (orientador), IB – UNICAMP

INTRODUÇÃO: O ritmo de envelhecimento da população mundial é crescente e, nos homens, a senescência propicia o desenvolvimento de doenças neoplásicas urológicas, principalmente na próstata (BERRY et al., 2008). O câncer de próstata (CaP) é um dos tipos de câncer que mais afeta homens no Brasil e no mundo (INCA, 2019; DEJOURS e KRISHNAN, 2021). Acredita-se que os precursores primários do CaP sejam lesões histopatológicas denominadas neoplasias intraepiteliais prostáticas (NIPs), as quais podem preceder o câncer em até 10 anos (MAJUMDER et al., 2008). As NIPs de baixo grau são caracterizadas como focos de estratificação e proliferação celular, apresentando células com aumento nuclear, nucléolo evidente e condensação da cromatina (KIDO et al., 2016). Já as NIPs de alto grau apresentam o padrão arquitetural papilar ou cribriforme, no qual a proliferação e estratificação invade o lúmen acinar (KIDO et al., 2016). Acredita-se que estas lesões de alto grau sejam precursoras do adenocarcinoma bem diferenciado, onde se observa a ruptura da membrana basal e a invasão do estroma por células epiteliais (KIDO et al., 2016).

No organismo senil, o microambiente estromal de diferentes órgãos está modificado devido ao acúmulo de fibroblastos senescentes cujo transcriptoma está alterado, resultando no chamado fenótipo secretor associado à senescência (SASP, do inglês: *Senescence-Associated Secretory Phenotype*) (CAMPISI, 2005; SPRENGER et al., 2008; COPPÉ et al., 2010; DAVALOS et al., 2010). Este fenótipo caracteriza-se pela secreção aumentada de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, atribuindo-lhe caráter essencialmente pró-inflamatório e pró-angiogênico (CAMPISI, 2005; SPRENGER et al., 2008; COPPÉ et al., 2010; DAVALOS et al., 2010). Paralelamente, a senescência também está associada ao acúmulo de células epiteliais portando mutações potencialmente oncogênicas, sendo o seu crescimento suprimido pelo microambiente adjacente (CAMPISI, 2005). Entretanto, as alterações estromais geradas pelos fibroblastos senescentes são capazes de atenuar essa supressão, favorecendo a proliferação e progressão dessas células epiteliais pré-neoplásicas em direção à malignidade (CAMPISI, 2005; DEAN e NELSON, 2008; SPRENGER et al., 2008; COPPÉ et al., 2010).

Assim, embora o compartimento epitelial seja o mais acometido por malignidades prostáticas, a senescência também resulta em modificações genótípicas e fenotípicas nas células estromais, coletivamente designadas pelo termo estroma reativo, que consiste em uma resposta ao dano ocasionado pelo carcinoma epitelial e caracteriza-se pelo influxo de células inflamatórias e indução de angiogênese, condições que favorecem a progressão tumoral (BARRON e ROWLEY, 2012; MONTICO et al., 2015). Sabe-se que o estroma reativo está relacionado a um microambiente de arquitetura estromal alterada, iniciando-se durante os primeiros estágios de desenvolvimento do CaP e evoluindo conjuntamente com a progressão da doença (BARRON & ROWLEY, 2012). Dentre as características que o definem, estão: aumento da remodelação da MEC, inflamação, angiogênese e presença de miofibroblastos, células que apresentam fenótipo intermediário entre células musculares lisas e fibroblastos, sendo caracterizados pela expressão de α -actina de músculo liso (α SMA) associada a outros marcadores mesenquimais como vimentina (VIM) (MONTICO et al., 2015).

Diante do exposto, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a resposta do estroma prostático a terapias anti-inflamatória e/ou antiangiogênica aplicadas no contexto da senescência, relacionando os efeitos observados ao fenótipo de estroma reativo que caracteriza o microambiente glandular nesse período da vida.

METODOLOGIA: Camundongos machos (n=16) da linhagem FVB (CEUA 6140-1/2022) com 52 semanas de idade foram divididos em 4 grupos experimentais: Grupo Senil Controle (SENCON), que foi dividido em subgrupos tratados com injeções intraperitoneais de DMSO ou carboximetilcelulose (CMC) 0,5% por via oral; Grupo Senil + Celecoxibe (SENCEL), recebeu 15 mg/kg de Celecoxibe suspenso em CMC 0,5% por via oral; Grupo Senil + SU5416 (SENSU), recebeu injeções 6 mg/Kg de SU5416 diluídos em DMSO por via intraperitoneal; Grupo Senil + Celecoxibe + SU5416, recebeu tratamento simultâneo com Celecoxibe e SU5416. Após 6 semanas de tratamento, todos os animais foram eutanasiados e amostras do lobo ventral da próstata foram coletadas e submetidas às análises de microscopia de luz e imunohistoquímica. Secções teciduais coradas com Hematoxilina-Eosina foram fotografadas e avaliadas de acordo com o método previamente descrito por LAMAS et al. (2020). Este método consiste na superposição de uma grade com 432 intersecções sobre o campo microscópico, de modo que os 4320 pontos obtidos para cada animal são classificados nos seguintes parâmetros morfológicos: Epitélio Saudável (ES), Neoplasia Intraepitelial Prostática (NIP), Epitélio Atrófico (EA), Estroma Fibromuscular (EF), Lúmen Acinar (LA) e Infiltrados Inflamatórios (II). O diagnóstico das lesões prostáticas foi baseado em critérios morfológicos de acordo com BILLIS (2003) e LAMAS et al. (2020). Nas análises imunohistoquímicas, os antígenos α SMA e VIM foram detectados utilizando-se os anticorpos *rabbit* policlonal ab5694 (*Abcam*) e *rabbit* monoclonal ab92547 (*Abcam*), respectivamente, conforme descrito por MONTICO et al. (2015). A distribuição da imunorreatividade foi determinada a partir de 10 campos aleatoriamente fotografados sob aumento de 400X em cada animal. A quantificação da reatividade baseou-se em um sistema de contagem de pontos envolvendo a aplicação de uma grade ao campo microscópico (WEIBEL, 1963). O número de intersecções da grade com positividade para α SMA e VIM foi contabilizado e expresso em porcentagem em relação ao total de intersecções. Os dados obtidos nas análises histopatológica foram submetidos a testes estatísticos para a comparação entre os grupos. A análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey foi utilizada para comparação entre médias de dados paramétricos, ao passo que valores com distribuição não paramétrica foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5% e expressas como média \pm erro padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Os resultados parciais deste estudo demonstraram que, embora os parâmetros morfológicos analisados variem entre os grupos experimentais, não foram registradas diferenças estatisticamente significativas entre as incidências de epitélio saudável, NIP, atrofia acinar, lúmen glandular e estroma fibromuscular (Figs. 1 e 2). Analogamente, apesar de ter oscilado nos diversos grupos, a frequência das reatividades da α SMA e VIM também não caracterizou diferenças significativas (Figs. 3 e 4). Apesar desses achados, algumas tendências observadas merecem ser mencionadas.

Grupos Experimentais	Aspectos Morfológicos				
	Epitélio Saudável (ES)	Neoplasia Intraepitelial Prostática (NIP)	Epitélio Atrófico (EA)	Lúmen Acinar (LA)	Estroma Fibromuscular (EF)
SENCON	26,23 \pm 1,446 a	1,613 \pm 0,4255 a	0,9750 \pm 0,07089 a	12,24 \pm 1,595 a	15,34 \pm 0,4988 a
SENCEL	24,24 \pm 0,8716 a	0,4220 \pm 0,1129 a	0,5740 \pm 0,3095 a	18,15 \pm 3,517 a	19,09 \pm 3,699 a
SENSU	21,97 \pm 2,606 a	0,9100 \pm 0,3589 a	1,645 \pm 0,5810 a	16,34 \pm 3,393 a	16,59 \pm 4,560 a
SENCELSU	26,68 \pm 2,878 a	0,4033 \pm 0,3312 a	0,9400 \pm 0,6413 a	10,77 \pm 1,642 a	13,58 \pm 2,732 a

Primeiramente, os grupos tratados com celecoxibe, isoladamente ou em associação ao SU5416, demonstraram redução numérica da frequência de lesões NIP quando comparados ao grupo controle (Fig. 2B). A influência desse agente inflamatório não-esteroidal sobre a progressão de lesões prostáticas foi registrada em estudos anteriores que utilizaram o modelo de camundongo transgênico para o adenocarcinoma de próstata (TRAMP) (KIDO et al., 2016; SILVA et al., 2018; MATEUS et al., 2019). Na maior parte dos casos, apesar de ter contribuído para a preservação da morfologia glandular, atenuando e/ou retardando a progressão do adenocarcinoma prostático e as alterações estromais, a administração de celecoxibe não foi capaz

de promover decréscimo significativo da frequência de lesões pré-malignas e/ou malignas (KIDO et al., 2016; MATEUS et al., 2019). Assim, dentre os lobos prostáticos, apenas a próstata anterior demonstrou maior sensibilidade aos efeitos deste fármaco, sendo que acréscimo da frequência de epitélio saudável e diminuição de focos de adenocarcinoma foram registrados como efeitos tardios do tratamento de camundongos TRAMP com celecoxibe (SILVA et al., 2018).

Figura 1. Fotomicrografias de secções da próstata dorsolateral de camundongos FVB senis coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E). EF: Estroma fibromuscular; ES: Epitélio saudável; LA: Lúmen acinar.

Tabela 1. Distribuição das incidências dos diferentes aspectos morfológicos na próstata dorsolateral dos grupos experimentais. Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa entre dois grupos experimentais ($P > 0,05$).

Em adição, o tratamento isolado com SU5416 demonstrou tendência à indução de atrofia epitelial (Fig. 2C), a qual encontra suporte nas frequências de áreas ocupadas por lúmen acinar e epitélio saudável (Figs. 2A e 2D), as quais demonstraram, respectivamente, elevação e decréscimo, sugerindo assim diminuição do pregueamento da mucosa e da área tecidual correspondente ao epitélio secretor. Sabe-se que o composto SU5416 inibe a atividade do receptor de membrana VEGFR-2, inibindo a cascata de sinalização de seu principal ligante, o VEGF, um dos principais fatores de crescimento envolvidos na angiogênese tumoral. Assim, a administração desse fármaco resulta em diminuição do suprimento sanguíneo e do fornecimento de nutrientes aos tecidos, inclusive tumorais (HUSS et al., 2003). De fato, MONTICO et al. (2015) verificaram que camundongos FVB senis com idade equivalente aos utilizados no presente estudo apresentaram decréscimo significativo dos níveis proteicos de VEGF e da neovascularização prostática quando submetidos ao tratamento com SU5416. Paralelamente, estes autores também registraram, a partir de análise qualitativa do tecido prostático, a presença de focos de atrofia acinar após a terapia com esse inibidor da angiogênese, o qual demonstrou-se capaz de atenuar e/ou interromper as desordens proliferativas associadas à senescência (MONTICO et al., 2014). Assim, com base nos resultados parciais deste estudo e nos dados da literatura, podemos sugerir que a atrofia epitelial

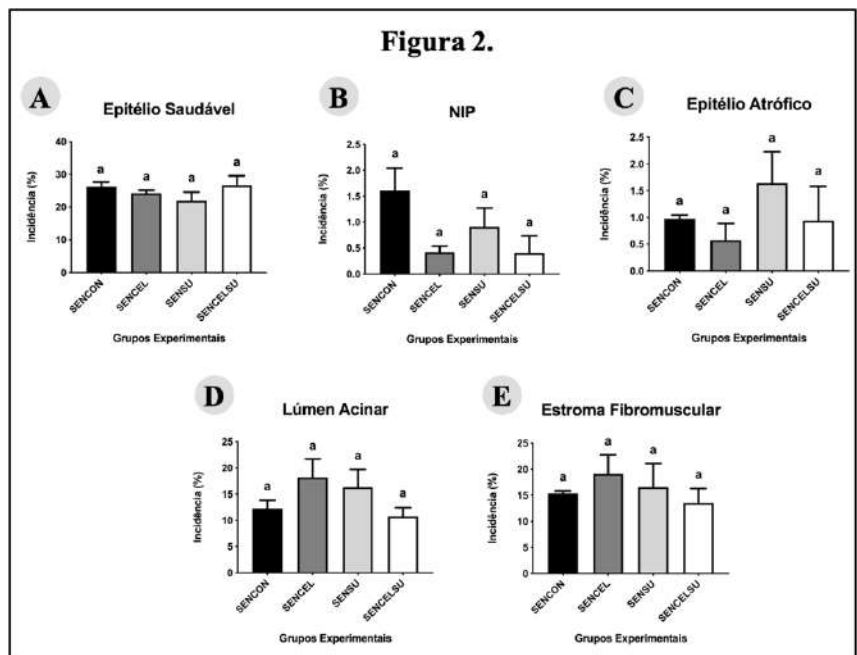
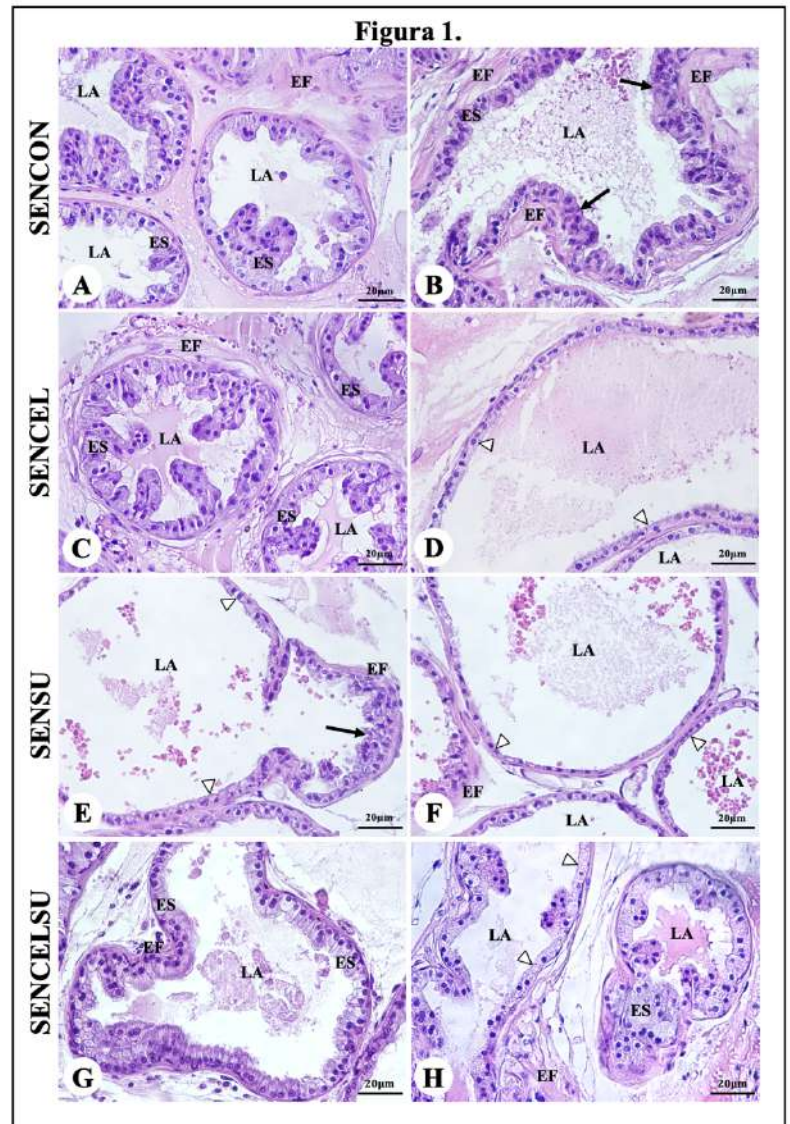


Figura 2. Incidência dos diferentes aspectos morfológicos epiteliais no lobo dorsolateral da próstata de camundongos dos grupos experimentais. Os dados estão apresentados como porcentagem média \pm erro padrão, sendo que, para um dado parâmetro, letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa entre dois grupos experimentais ($P > 0,05$).

observada no grupo SENSU representa uma resposta adaptativa do epitélio prostático, em que as células reduzem sua atividade secretora frente às condições de restrição de oxigênio e nutrientes impostas pela diminuição da rede vascular do órgão. Mais ainda, tal atrofia epitelial pode ser considerada um efeito positivo da terapia antiangiogênica, uma vez que impede que as células epiteliais proliferem desordenadamente e, assim, possam progredir para a transformação maligna.

Os resultados das análises imunohistoquímicas para α SMA demonstraram tendência à diminuição da reatividade desse marcador de células musculares lisas no grupo que recebeu a combinação de celecoxibe e SU5416 (Fig. 3). Paralelamente, a reatividade de VIM, localizada em células do estroma fibromuscular e nas paredes vasculares, também demonstrou redução numérica após o tratamento com SU5416, seja isoladamente ou em associação com o celecoxibe (Fig. 4), ainda que tal decréscimo não tenha atingido significância estatística frente ao número de amostras analisadas. Nesse cenário, embora os efeitos deste inibidor da angiogênese sobre a expressão de α SMA e VIM já tenham sido avaliados no tecido prostático de animais senis, tendo resultado em redução da imunoreatividade e níveis proteicos desses marcadores (MONTICO et al., 2015), o presente projeto propôs aprofundar essa investigação, avaliando também os efeitos do celecoxibe e de sua associação com o SU5416 sobre essas moléculas com importante papel na dinâmica do estroma prostático, tanto em condições normais como patológicas. Por ora, os resultados deste estudo não nos permitem concluir se, de fato, houve decréscimo da expressão de α SMA e VIM após a terapia combinada e, se foi este o caso, em que medida essa diminuição representa a regressão de uma possível reação estromal associada à senescência. Entretanto, com base em resultados anteriores de nosso grupo de pesquisa, em que demonstramos a atenuação do fenótipo de estroma reativo, tanto na senescência frente à associação de diferentes inibidores da angiogênese (MONTICO et al., 2015), como no microambiente estromal de camundongos TRAMP submetidos à associação de terapias antiangiogênica e anti-inflamatória (MATEUS et al., 2019), acreditamos que a realização de experimentos adicionais poderá confirmar as tendências observadas até o momento.

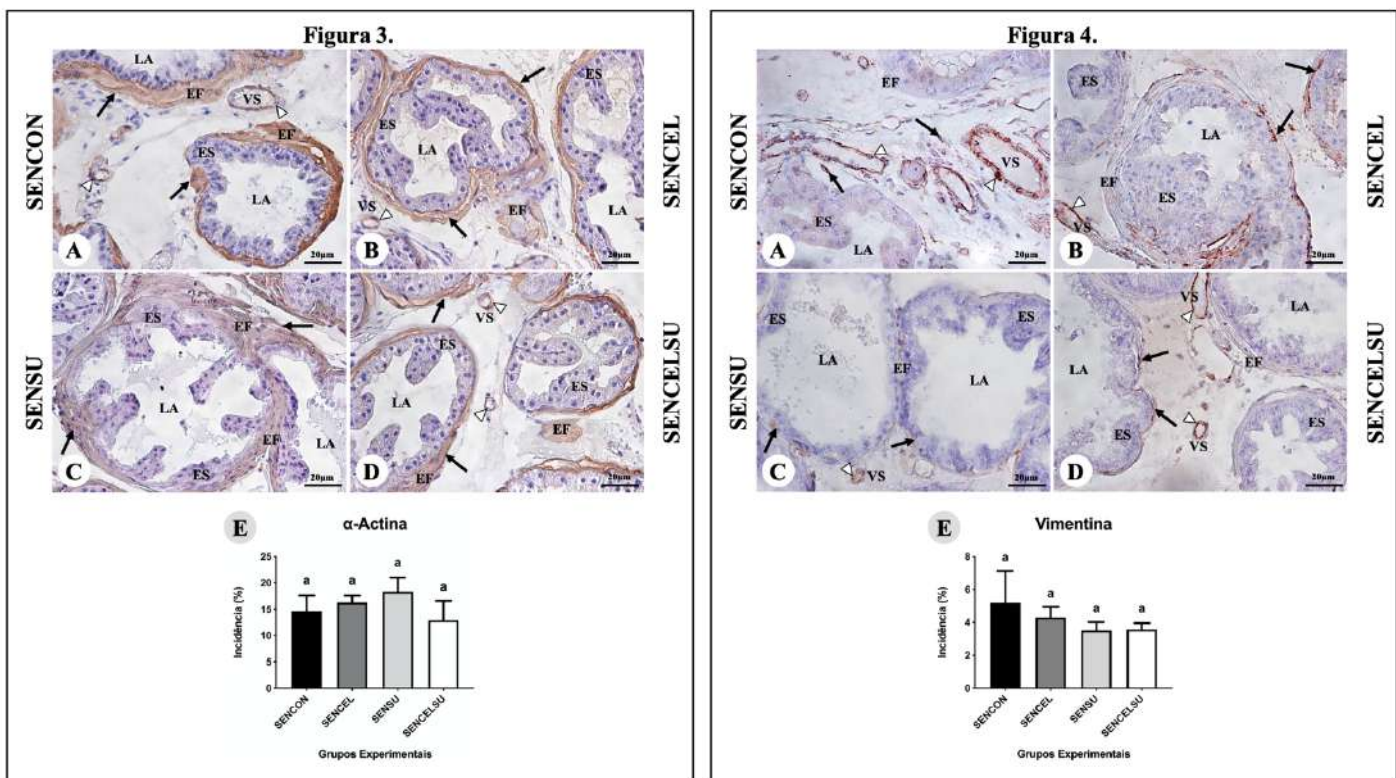


Figura 3. Imunoreatividade de alfa-actina de músculo liso (α SMA) no lobo dorsolateral da próstata de camundongos FVB senis. Setas pretas indicam positividade para α SMA na camada fibromuscular periacinar e cabeças de setas brancas indicam reatividade na musculatura lisa da parede de vasos sanguíneos. EF: Estroma fibromuscular; ES: Epitélio saudável; LA: Lúmen acinar; VS: Vaso sanguíneo. Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa entre dois grupos experimentais ($P > 0,05$).

Figura 4. Imunoreatividade da vimentina (VIM) no lobo dorsolateral da próstata de camundongos FVB senis. Setas pretas indicam positividade para VIM em células estromais e cabeças de setas brancas indicam reatividade na parede de vasos sanguíneos. EF: Estroma fibromuscular; ES: Epitélio saudável; LA: Lúmen acinar; VS: Vaso sanguíneo. Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa entre dois grupos experimentais ($P > 0,05$).

CONCLUSÕES: Em suma, acreditamos que o tamanho amostral reduzido obtido até o presente momento (n=4) possa ter impactado as análises estatísticas em virtude da ampla variação dos dados nos grupos experimentais, resultando em ausência de significância nas comparações entre os mesmos. Assim, análises adicionais estão sendo executadas, com a ampliação do número de amostras submetidas à avaliação morfológica e à imunohistoquímica para α SMA e VIM, as quais serão essenciais para a confirmação das tendências observadas. Caso isso ocorra, como observado em estudos similares realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa, os presentes resultados fornecerão suporte adicional para o desenvolvimento de testes clínicos utilizando terapias que combinem agentes anti-inflamatórios e antiangiogênicos no tratamento dos processos patológicos prostáticos associados à senescência, tanto os de natureza benigna como maligna, haja vista o papel fundamental do compartimento estromal nessas desordens glandulares.

BIBLIOGRAFIA

1.BARRON, D.A.; ROWLEY, D.R. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocrine Related Cancer*. v. 19, n. 6, p. R187- R204, 2012. 2.BERRY, P.A.; MAITLAND, N.J; COLLINS, A.T. Androgen receptor signaling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v.288, n.1-2, p.30-37, 2008. 3.BILLIS, A. Patologia cirúrgica da próstata. Impressão Digital do Brasil Gráfica e Editora Ltda. Campinas, 2003. 4.CAMPISI, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. v. 120, n. 4, p. 513-522, 2005. 5.COPPÉ, J.P.; DESPREZ, P.Y.; KRTOLICA, A.; CAMPISI, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathology*. v. 5, p. 99-118, 2010. 6.DAVALOS, A.R.; COPPÉ, J.P.; CAMPISI, J.; DESPREZ, P.Y. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Reviews*. v. 29, n. 2, p. 273-283, 2010. 7.DEAN, J.P.; NELSON, P.S. Profiling influences of senescent and aged fibroblasts on prostate carcinogenesis. *British Journal of Cancer*. v. 98, n. 2, p. 245-249, 2008. 8.DEJOURS, CORINNE; KRISHNAN, U.M. Sensors for diagnosis of prostate cancer: Looking beyond the prostate specific antigen. *Biosensors and Bioelectronics*. v.173, p. 112-790, 2021. 9.GINGRICH JR. et al. Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, v. 2, n. 2, p. 70-75, 1999. 10.12.HUSS, W.J.; et al. Retinoic acid slows progression and promotes apoptosis of spontaneous prostate cancer. *Prostate*.v. 54, n. 1, p. 8-16, 2003. 11.HUSS, W.J. et al. Origin of androgen-insensitive poorly differentiated tumors in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. *Neoplasia* v. 9, n. 11, p. 938-50, 2007. 12.INCA. Estimate/2020 – Cancer Incidence in Brazil. In. Rio de Janeiro 2019:1-130. 13.JOHNSON, MA. et al. Castration triggers growth of previously static androgen-independent lesions in the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model. *Prostate* v. 62, n. 4, p. 322-38, 2005. 14.KAPLAN-LEFKO, P.J. et al. Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model. *Prostate* v. 55, n. 3, p. 219-37, 2003. 15.KIDO, LA; MONTICO, F; SAUCE, R; et al. Anti-inflammatory therapies in TRAMP mice: delay in PCa progression. *Endocrine-related cancer*. v. 23, n. 4, p. 235-250, 2016. 16.KIRBY, M. et al. Characterizing the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *Int J Clin Pract* v. 65, n. 11, p. 1180-92, 2011. 17.LAMAS, Celina A. et al. A jaboticaba extract prevents prostatic damage associated with aging and high-fat diet intake. *Food & Function*. v. 11, n. 2, p. 1547-1559, 2020. 18.MAJUMDER, P.K. et al. A prostatic intraepithelial neoplasia-dependent p27 Kip1 checkpoint induces senescence and inhibits cell proliferation and cancer progression. *Cancer Cell*. v.14, n.2, p. 146-155, 2008. 19.MATEUS, P.A.M.; et al. *Prostate*. v. 79, n. 5, p. 515-535, 2019. 20.MONTGOMERY, DC. *Design and Analysis of Experiments*. 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991. 21.MONTICO F., et al. Reactive stroma in the prostate during late life:The role of microvasculature and antiangiogenic therapy influences. *The Prostate*. v. 75, n. 14, p. 1643-1661, 2015. 22.MONTICO F., et, al. 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*. v. 142, v. 3, p. 269-284, 2014. 23.SILVA, R.S.; *Cell Biol Int*. v. 42, n. 8, p. 1006-1020, 2018. 24.SPRENGER C.C.; PLYMATE S.R.; REED M.J. Extracellular influences on tumour angiogenesis in the aged host. *British Journal of Cancer*. v. 98, n. 2, p. 250-255, 2008. 25.WANG, G. et al. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & Development* v. 32, n° 17-18, p. 1105-1140, 2018. 26.WEIBEL, ER. *Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs*. *Lab Invest*. v. 12, p. 131-155, 1963. 27.ZAR, JH. *Biostatistical analysis*. 4th edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 1999.