

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE**

ANTONIO CARLOS DE ABREU

**MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR ORTOTÓPICO DE PRÓSTATA
HUMANO XENOTRANPLANTADOS EM CAMUNDONGOS
IMUNOSSUPRIMIDOS FARMACOLÓGICAMENTE**

**CAMPO GRANDE - MS
2020**

ANTONIO CARLOS DE ABREU

**MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR ORTOTÓPICO DE PRÓSTATA
HUMANO XENOTRANPLANTADOS EM CAMUNDONGOS
IMUNOSSUPRIMIDOS FARMACOLÓGICAMENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Carcinogênese experimental e estudos do câncer na região Centro-oeste

Orientador: Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho

CAMPO GRANDE – MS
2020

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANTONIO CARLOS DE ABREU

MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR ORTOTÓPICO DE PRÓSTATA HUMANO XENOTRANPLANTADOS EM CAMUNDONGOS IMUNOSSUPRIMIDOS FARMACOLÓGICAMENTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Carcinogênese experimental e estudos do câncer na região Centro-oeste

Orientador: Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho

APROVADA EM: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho

Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste - UFMS

Profa Dra Danielle Bogo

Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste – UFMS

Prof Dr Sebastião Martins de Souza Neto

Instituto Integrado de Saúde – UFMS

DEDICATÓRIA

**Minha dedicação a Deus, que apesar de toda imperfeição da obra humana através Dele todas as coisas se aperfeiçoam. A Ti Senhor, toda Honra e toda a Glória, a Ti todo Louvor e Adoração. A Ti Senhor toda a minha imperfeição. Louvado seja o Teu Nome Senhor. Bendito seja sobre todas as coisas.
Amém**

AGRADECIMENTOS

A minha família, Gi, João, Isabella e Anna, na certeza de que a família se consuma da união de homem e uma mulher e, se aperfeiçoa da direção divina de vivermos juntos, Obrigado por serem minha sustentação de amor e júbilo pois, sem o amor de vocês e a alegria de poder sempre poder voltar e recomeçar não poderia existir.

Gislaine, NEOQAV(Nunca Esqueça O Quanto Amo Você) esposa e amor, de alegrias e dificuldades, dificuldades de escrever e raciocinar neste projeto, obrigado pelo seu tempo, obrigado pela inspiração que és pois, ver a facilidade como coloca seu pensar me orgulha e inspira. NEOAQEAV.

Ao meu Pai terreno, Pai João, exemplo de luta e persistência, de gratidão e carinho, sempre tentou fazer o melhor por mim, na tentativa de conciliar sua existência e vontades. Com certeza nunca deixará de existir em mim, muito obrigado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho, por mais que as minhas dificuldades limitassem o aprendizado, me levou além do aprender, ao aprender fazendo. Este projeto não existiria sem ele. Muito obrigado pela paciência e conhecimento doado. Obrigado.

Ao meu grato amigo e parceiro de pós-graduação e mestrado, Dr. Cezar Augusto Sobrinho, nunca senti tamanho amor e dedicação por alguém não tão próximo mas, tão chegado. Muito obrigado.

A Prof. Dra Iandara S Silva, pelos conhecimentos e espaço cedido no Laboratório de Modelos Animais, Muito Obrigado.

Aos que aprenderam comigo a executar aquilo que ainda estamos aprendendo, Evair, Karina e Cinthia, muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Gilberto Facco, professor de Patologia da Universidade Uniderp, que se dispôs a fazer a leitura das lâminas de histologia dessa pesquisa.

A Profa. Dra Danielle Bogo, que através do Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares da UFMS, cedeu as células de Tumor de Próstata Humana (PC-03) e contribuiu fundamentalmente para a qualificação desta dissertação.

A Totó Company- Clínica Veterinária, lugar de sustento mas, também de grande desafio. Onde aprendo dia-a-dia a ser melhor profissional. Obrigado Sra Rute Marques, que eu acredito que sempre tentou fazer o melhor pela Totó Company e, a todos os atuais profissionais e, aqueles que hoje não estão na Totó Company mas, ajudaram a fazer dela o que é hoje, referência na saúde dos cães e gatos de Campo Grande e Mato Grosso do Sul.

Ao Basquete, esporte que me moldou física e emocionalmente, que me tirou das ruas e me fez ter anseio de vitória. E como diz Kobe Bryan, *pela sensação de paz e fuga que me faz sentir o melhor de mim mesmo*. Obrigado.

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste onde pude desenvolver o aprendizado e a pesquisa, na tentativa de multiplicar conhecimento.

A CAPES/FUNDECT, por todo processo estrutural de ensino, que permeia a pesquisa e o desenvolvimento de programas de pós-graduação no Brasil.

EPÍGRAFE

“o maior inimigo do conhecimento não é a ignorância, mas sim a ilusão da verdade”
Stephen Hawking
“e conhecerão a verdade, e a verdade os libertará”
João 8:32

RESUMO

ABREU, C. A. MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR ORTOTÓPICO DE PRÓSTATA HUMANO XENOTRANPLANTADOS EM CAMUNDONGOS IMUNOSSUPRIMIDOS FARMACOLÓGICAMENTE. Campo Grande; 2020. [Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Objetivo: Estudar um modelo experimental de tumor ortotópico de próstata humano xenotransplantado em camundongos imunossuprimidos farmacologicamente.

Metodologia: Foram utilizados 40 camundongos *hairless* divididos em 4 grupos aleatórios, sendo Grupo (G1) controle; Grupo (G2) imunossuprimido farmacologicamente com Ciclofosfamida; Grupo (G3) imunossuprimido farmacologicamente com Dexametasona; Grupo (G4) imunossuprimido com Ciclosporina. A imunossupressão ocorreu no 5º dia após adaptação dos animais e, a inoculação ortotópica na próstata de camundongos *hairless* de 5×10^5 células PC-03 xenotransplantadas, foram realizadas 1 dia depois do início da imunossupressão. No 14º dia ocorreu a eutanásia e a coleta do material prostático para análise histopatológica e imuno-histoquímica.

Resultados: Na análise histopatológica observamos alterações no Grupo G1 de hiperplasia leve (50%), hiperplasia moderada (33,3%), neoplasia (17%), degeneração leve (50%), degeneração moderada (50%); no Grupo G2 hiperplasia leve (50%), hiperplasia moderada (25%), degeneração moderada (75%); no Grupo G3 hiperplasia leve (50%) e hiperplasia moderada (50%), degeneração leve (40%), degeneração moderada (40%) e degeneração intensa (20%), inflamação leve (10%); no Grupo G4, hiperplasia leve (30%), hiperplasia moderada (40%), hiperplasia intensa (30%), neoplasia (10%), degeneração leve (60%), degeneração moderada (40%), inflamação leve (20%). A avaliação da expressão Imuno-histoquímica do biomarcador Ki-67 realizada nos cortes histológicas das próstatas dos animais dos grupos G1, G2, G3 e G4 não demonstrou expressão do biomarcador em nenhuma célula analisada que pudesse configurar um crescimento de linhagem celular humana PC-03 nos referidos animais.

Conclusão . Nos animais submetidos a imunossupressão por dexametasona, ciclosporina e ciclofosfamida não apresentaram desenvolvimento tumoral de células PC3 (Células tumorais prostática humanas). Foram observados nos grupos controle e ciclosporina a presença de neoplasia de próstata e diversas alterações histológicas compatíveis com hiperplasia e degeneração prostática o que define que as alterações provocadas nos animais do experimento favoreceram um ambiente próprio para as alterações na próstata murina.

Palavras Chaves: neoplasia de próstata, modelo animal, próstata, imunologia tumoral

ABSTRACT

ABREU, C. A. EXPERIMENTAL MODEL OF XENOTRANPLANTED HUMAN PROSTATE ORTOTOPIC TUMOR IN PHARMACOLOGICALLY IMMUNOSUPPRESSED MICE. Campo Grande; 2020. [Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Objective: To study an experimental model of xenotransplanted human prostate orthotopic tumor in immunologically suppressed mice.

Methodology: Forty hairless mice were used, divided into 4 random groups, being Group (G1) control; Group (G2) immunosuppressed pharmacologically with cyclophosphamide; Group (G3) immunosuppressed pharmacologically with Dexamethasone; Group (G4) immunosuppressed with Cyclosporin. Immunosuppression took place on the 5th day after adaptation of the animals, and orthotopic inoculation in the prostate of 5×10^5 xenotransplanted PC-03 hairless mice was performed 1 day after the start of immunosuppression. On the 14th day, euthanasia and prostatic material were collected for histopathological and immunohistochemical analysis.

Results: In histopathological analysis, we observed changes in Group G1 of mild hyperplasia (50%), moderate hyperplasia (33.3%), neoplasia (17%), mild degeneration (50%), moderate degeneration (50%); in Group G2 mild hyperplasia (50%), moderate hyperplasia (25%), moderate degeneration (75%); in Group G3 mild hyperplasia (50%) and moderate hyperplasia (50%), mild degeneration (40%), moderate degeneration (40%) and severe degeneration (20%), mild inflammation (10%); in Group G4, mild hyperplasia (30%), moderate hyperplasia (40%), intense hyperplasia (30%), neoplasia (10%), mild degeneration (60%), moderate degeneration (40%), mild inflammation (20%) An evaluation of the immunohistochemistry expression of the biomarker Ki-67 performed in the histological sections of the prostates of animals of the groups G1, G2, G3, and G4 did not demonstrate the expression of the biomarker in any of the analyzed analyzes that may configure the growth of the human lineage PC3 in the animals.

Conclusion: In animals submitted to immunosuppression by dexamethasone, cyclosporine and cyclophosphamide did not show tumor development of PC3 cells (human prostate tumor cells). In the control and cyclosporine groups, we observed the presence of prostate cancer and several histological alterations compatible with hyperplasia and prostatic degeneration, which defines that the changes caused in the animals of the experiment favored a proper environment for the changes in the murine prostate.

Keywords: prostate cancer, animal model, prostate, tumor immunology

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% - Porcento

µm - Micrômetro

10x - Aumento de 10 vezes ao microscópio óptico

40x – Aumento de 40 vezes ao microscópio óptico

AD – Água destilada

ad libitum – À vontade

APC – Antigen presenting cells

CD – Células Dendríticas

CP – Câncer de Próstata

CsA - Ciclosporina

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

Cy - Ciclofosfamida

DCNT – Doença Crônica Não Transmissível

Dx – Dexametasona

EDTA

et al. – E outros

HE – Hematoxilina Eosina

IP – Intra Peritoneal

PDGF – Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas

PC-03 – Células de carcinoma de próstata

PSA – Antígeno Prostático Específico

Rpm – rotações por minuto

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SFB – Soro Fetal Bovino

SBU – Sociedade Brasileira de Urologia

NK – Natural Killer

OMS – Organização Mundial da Saúde

Ki-67 – Antígeno Nuclear de Células Proliferativas Humanas

W – Mundo

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Resultados das alterações histológicas, em cada um dos grupos experimentais avaliados.....	39
Tabela 2:	Alterações histopatológicas do grupo ciclosporina (Cy).....	57
Tabela 3:	Alterações histopatológicas do grupo dexametasona (Dx).....	58
Tabela 4:	Alterações histopatológicas do grupo ciclofosfamida (CsA).....	59
Tabela 5:	Alterações histopatológicas do grupo controle (Co).....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Mapa do ranking global do câncer como causa de óbitos em idades abaixo de 70 anos no ano de 2015.....	16
Figura 2:	Quadro com dados estatísticos dos cânceres de acordo com o órgão primário acometido, número de novos casos e número de óbitos.....	17
Figura 3:	Gráfico das taxas padronizadas por idade de incidência e mortalidade específicas da região para cânceres de próstata em 2018.....	19
Figura 4:	Ilustração da anatomia da próstata e órgãos adjacentes.....	21
Figura 5:	Comparação da arquitetura das glândulas prostaticas humanas e camundongos.....	22
Figura 6:	Ilustração de próstata normal e com hiperplasia benigna.....	23
Figura 7:	Ilustração do câncer de próstata em três locais dentro da glândula.....	24
Figura 8:	Linha do tempo demonstrativo do experimento.....	35
Figura 9:	Demonstração esquemática da implantação do tumor.....	36
Figura 10:	Desenho do experimento de acordo com a evolução dos processos.....	39
Figura 11:	Fotomicrografia de animal do grupo controle contendo ácinos com precipitação proteica e hiperplasia prostática.....	40
Figura 12:	Fotomicrografia de animal do grupo controle mostrando ácino com hiperplasia.....	41
Figura 13:	Fotomicrografia de próstata de animal tratado com ciclofosfamida mostrando ácinos com áreas de hiperplasia.....	42
Figura 14:	Fotomicrografia (B) de secção histológica de próstata de camundongo de grupo tratado com dexametasona (DX) exibindo ácino com hiperplasia (setas). Coloração de HE. Aumento de 40X.....	43
Figura 15:	Fotomicrografia (B) de secção histológica da próstata de camundongo de grupo Dexametasona (Dx) exibindo área de infiltrado inflamatório mononuclear difusamente distribuído (quadrado). Coloração de HE. Aumento de 10X.....	43
Figura 16:	Fotomicrografia (A) de secção histológica de próstata de camundongo do grupo tratado com ciclosporina exibindo área de neoplasia glandular maligna (círculo). Coloração de HE. Aumento de 10X.....	44
Figura 17:	Fotomicrografia (A) de secção histológica de próstata de camundongo de grupo tratado com ciclosporina exibindo ácino com hiperplasia (setas). Coloração de HE. Aumento de 40X.....	45

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1.	Epidemiologia do câncer.....	16
2.2.	Epidemiologia do câncer de próstata	18
2.3.	Anatomia da próstata humana.....	20
2.4.	Neoplasias da próstata.....	22
2.5.	Modelos experimentais de câncer.....	24
2.6.	Exame histopatológico e imuno-histoquímica	26
2.7.	Modelos experimentais de câncer de próstata	27
2.8.	Uso de drogas imunossupressoras em estudos experimentais de câncer.....	29
3.	OBJETIVOS	32
3.1.	Objetivo Geral.....	32
3.2.	Objetivos Específicos	32
4.	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1.	Aspectos éticos	33
4.2.	Tipo de pesquisa	33
4.3.	Local da pesquisa.....	33
4.4.	Cultura celular	33
4.5.	Animais.....	34
4.6.	Tratamento	34
4.7.	Monitoramento dos animais	37
4.8.	Eutanásia.....	37
4.9.	Procedimento de necrópsia	37
4.10.	Processamento do material prostático para exame histopatológico.....	37
4.11.	Expressão imuno-histoquímica do biomarcador Ki-67.....	37
4.12.	Análise histopatológica das lâminas	37
4.13.	Análise dos dados.....	38
5.	RESULTADOS.....	38
5.1.	Avaliação histopatológica.....	38
5.2.	Avaliação imuno-histoquímica.....	45
6.	DISCUSSÃO.....	46
7.	CONCLUSÃO.....	49
8.	REFERÊNCIAS.....	50
9.	APÊNDICE.....	56
10.	ANEXOS.....	60

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento econômico e social traz repercussões diretas no meio ambiente e na saúde das populações, sendo uma das principais consequências a alteração do perfil de morbimortalidade (MENDONÇA, 1993). O impacto dos problemas ambientais sobre a saúde humana pode se manifestar sob a forma de agravos agudos e/ou crônicos.

Como exemplo de agravo crônico, podemos citar os riscos à saúde humana, especificamente o risco de câncer, que têm sido objeto de grande interesse científico (NUNES; TAJARA, 1998; GUERRA; GALO; MENDONÇA, 2005).

O câncer é considerado um problema de saúde pública no mundo, e uma das principais causas de mortalidade, apresentando um importante ônus psicossocial e econômico (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). É responsável por um terço dos óbitos no mundo, sendo este impacto sentido principalmente por países de condições precárias de subsistência e subdesenvolvidos, tal como, Brasil. Por exemplo, ao abordar à mortalidade precoce, estima-se que, em 2008, 36 milhões dos óbitos (63%) ocorreram em consequência de doenças crônicas não transmissíveis, no caso, câncer (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013; BRASIL, 2018).

De acordo com a OMS (2019), “Câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento de células anormais além de seus limites habituais que podem então invadir partes adjacentes do corpo e / ou se espalhar para outros órgãos” (WORD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

O termo câncer é um termo comum utilizado para todas as neoplasias malignas e é tida como uma doença multifatorial, em que seu desenvolvimento depende de fatores genéticos (mutações hereditárias ou esporádicas) e ambientais (agentes carcinogênicos), por outro lado o termo neoplasia significa “novo crescimento”, definido como “uma massa de tecido anormal que cresce de forma incoordenada e excedente em relação ao tecido normal e persiste em crescer da mesma maneira após cessar o estímulo que causou a sua mudança” (DALECK, DE NARDI, 2016).

Segundo Quijada et al, (2017) o câncer de próstata apresentou alta frequência a nível mundial, está presente em todos os países da América, na Europa, Austrália e África, sendo

considerado o segundo tipo de câncer mais comum em homens em todo o mundo. No ano de 2012 foram estimados cerca de 1 milhão de novos casos, no Brasil é o tipo de câncer mais incidente em todas as regiões, desconsiderando os tumores de pele não melanômico, sendo que em 2016 foram estimados cerca de 61.200 casos para cada 100.000 habitantes (INCA,2016). De acordo com Quijada et al, (2017) *“a maioria dos diagnósticos de câncer de próstata está associada a homens acima de 65 anos e menos de 1% a homens com idades abaixo dos 50 anos. Com o aumento da expectativa de vida mundial, é esperado que o número de casos novos aumente cerca de 60%”* (QUIJADA et al, 2017).

Dados da American Câncer Society (2015) evidenciam que o câncer de próstata atinge homens de todas as raças, “sendo uma ameaça silenciosa a saúde dos homens”, ocupando o terceiro lugar como causa de mortes por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), sendo que segundo as estatísticas americanas um em cada seis homens no mundo desenvolverá câncer de próstata (CP) ao longo de sua vida.

De acordo com a American Câncer Society, em 2016, foram estimados mais de 180.000 novos casos de CP diagnosticados nos EUA, resultando em cerca de 26.000 mortes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou para o período de 2018 e 2019 o risco de 66.120 casos novos para cada 100 mil homens brasileiros, sendo essa incidência muito superior à encontrada em países desenvolvidos, como Estados Unidos, Canadá e Inglaterra (BRASIL, 2017).

De acordo com Araújo, Conceição e Zago (2019), *“a cura para o CP é um fenômeno investigado por múltiplas perspectivas científicas e a cada ano novas descobertas são evidenciadas”*, onde ter a doença e viver com ela ainda é desafiador no que se refere ao cuidado dispensado aos pacientes e a implementação de políticas públicas no sistema de saúde direcionadas para o tratamento da doença. No Brasil, por exemplo, os tratamentos disponíveis apresentam efeitos colaterais como disfunção sexual, alterações na imagem corporal e o estigma social, efeitos estes que muitas vezes tornam o paciente ainda mais vulnerável, principalmente em relação aos aspectos que envolvem sua masculinidade (JAMES et al, 2017; ROMANZINI et al 2018).

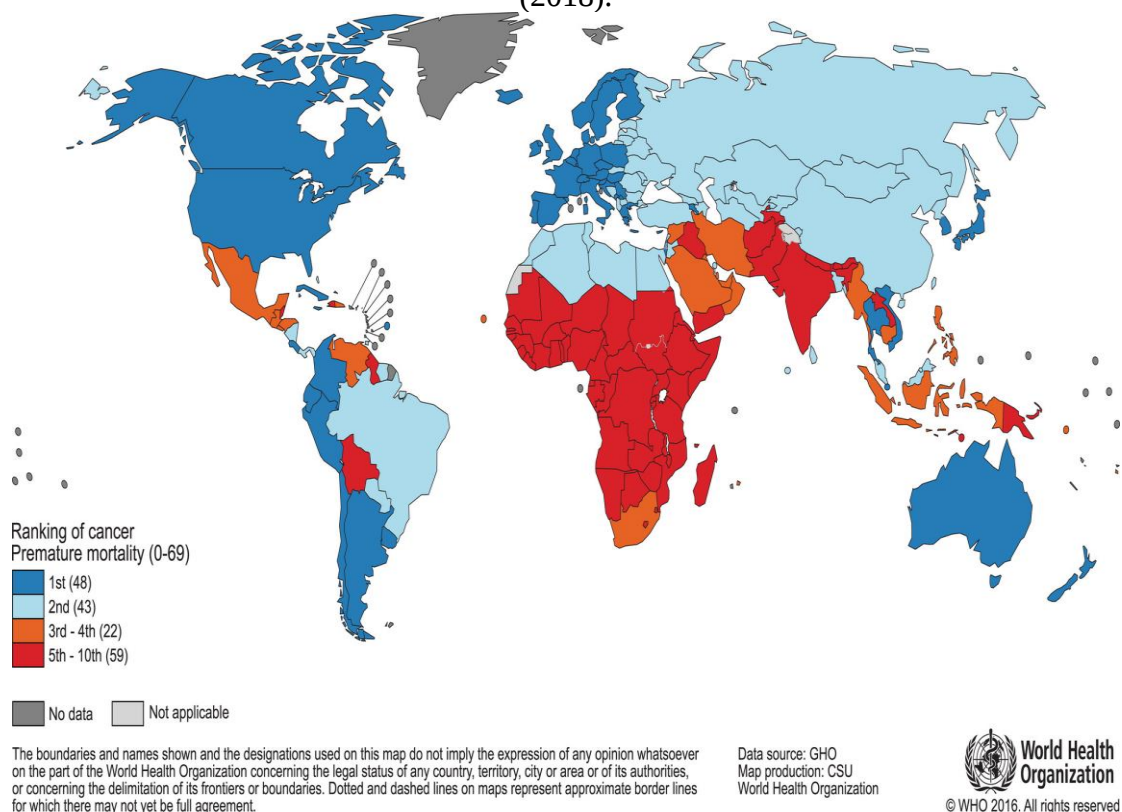
Neste contexto o objetivo desse trabalho foi desenvolver um modelo de tumor ortotópico de próstata humano xenotransplantado em camundongos imunossuprimidos, para que os resultados obtidos sejam utilizados para o desenvolvimento de novas pesquisas sobre o estudo dos mecanismos moleculares da carcinogênese, na tentativa avaliar medidas terapêuticas para os cânceres.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Epidemiologia do Câncer

A incidência e mortalidade por câncer vem crescendo de forma acentuada em todo o mundo, as causas são complexas e refletem o envelhecimento e o crescimento demográfico da população, onde as mudanças na prevalência e distribuição dos fatores de risco para a doença podem estar associadas a questões que envolvem o desenvolvimento econômico global (BRAY et al 2018). De acordo com a figura 1, estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2015 o câncer foi a segunda principal causa de óbito antes dos setenta anos de idade em 91 dos 172 países do mundo e, do mesmo modo o câncer ocupando a terceira e quarta posição em mais 22 países do mundo (OMS,2018).

Figura 1: Mapa global do ranking nacional de câncer como causa de óbitos em idades abaixo de 70 anos no ano de 2015. Fonte: Organização Mundial de Saúde (2018) In: Bray et al (2018).



De acordo com dados da figura 2, do relatório sobre a carga global de câncer, produzido pela agência Internacional de pesquisas sobre câncer, foram estimados no ano 2018, aproximadamente 18,1 milhões de casos novos de câncer, e 9,6 milhões de óbitos pela doença em todo o mundo, distribuídos por tipo de câncer (BRAY et al, 2018).

Figura 2. Dados estatísticos dos cânceres de acordo com o órgão primário acometido, número de novos casos e número de óbitos.

ÓRGÃO DO TUMOR PRIMÁRIO	NÚMERO DE CASOS NOVOS DE ACORDO COM O ÓRGÃO (%)	NÚMEROS DE ÓBITOS (%)
Ânus	4,541 (0,3)	19.129 (0,2)
Bexiga	549.393 (3,0)	199.922 (2,1)
Cérebro e sistema nervoso	29 6.851 (1,6)	241.037 (2,5)
Colo uterino	569.847 (3,2)	311, 3 65 (3. 3)
Cólon	1,0 9 6, 6 01 (6 .1)	551.269 (5,8)
Corpo do utero	3 82,0 69 (2,1)	89.929 (0,9)
Esôfago	572,034 (3,2)	508,585 (5.3)
Estômago	1.033.701 (5,7)	782.685 (8,2)
Fígado	41.080 (4,7)	781.631 (8,2)
Glândulas salivares	52.799 (0,3)	22.176 (0,2)
Hipofaringe	80,608 (0,4)	34.984 (0,4)
Lábio da cavidade oral	354.864 (2,0)	177,3 8 4 (1,9)
Laringe	177, 422 (1,0)	94,771 (1,0)
Leucemia	437.033 (2,4)	309,006 (3,2)
Linfoma de hodgkin	79.990 (0,4)	26.167 (0,3)
Linfoma não-hodgkin	509.590 (2,8)	248.724 (2,6)
Mama	2.088.849 (11,6)	626.679 (6,6)
Melanoma da pele	287,72 3 (1,6)	60,712 (0,6)
Mesotelioma	30,443 (0,2)	25,576 (0,3)
Mieloma múltiplo	159,985 (0,9)	106.105 (1,1)
Não melanoma da pele	1.042.056 (5,8)	65, 155 (0,7)
Nasofaringe	129,079 (0,7)	72,987 (0,8)
Orofaringe	92,887 (0,5)	51,005 (0,5)
Ovário	295.414 (1,6)	184.799 (1,9)
Pâncreas	458.918 (2,5)	432.242 (4,5)
Pênis	34.475 (0,2)	15.138 (0,2%)
Próstata	1,276 ,10 6 (7.1)	358,989 (3.8)
Pulmão	2.093.876 (11,6)	1.761.007 (18,4)
Reto	704,376 (3,9)	310,394 (3,2)

Continuação...		
Rim	403.262 (2,2)	175.098 (1,8)
Sarcoma de kaposi	41.799 (0,2)	19.902 (0,2)
Testículo	71.105 (0,4)	9.507 (0,1)
Tireoide	567,233 (3,1)	41.071 (0,4)
Vagina	17,6 0 0 (0,1)	8.062 (0,1)
Vesícula biliar	219,420 (1,2)	165,087 (1,7)
Vulva	44.235 (0,2)	15.222 (0,2)
Todos os tipos exceto pele	17,036,901	9,489,872
Todos os tipos	18,078,957	9,555,027

2.2. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE PRÓTATA

De acordo com Bray et al (2018) o câncer de próstata (CP) é o segundo tipo de câncer mais incidente e segunda causa de óbitos por câncer no sexo masculino em 46 países, e o tipo de câncer mais diagnosticado entre homens em todo mundo, estando presente principalmente nas Américas, Europa do Norte e Ocidental, Austrália, Nova Zelândia e grande parte dos países subdesenvolvidos. Apesar de não se ter um conhecimento claro acerca da etiologia e fatores de risco, é possível observar taxas mais elevadas entre homens de ascendência africana nos Estados Unidos e no Caribe, podendo ser associadas tais taxas com predisposição étnica e genética (REBBECK et al, 2013).

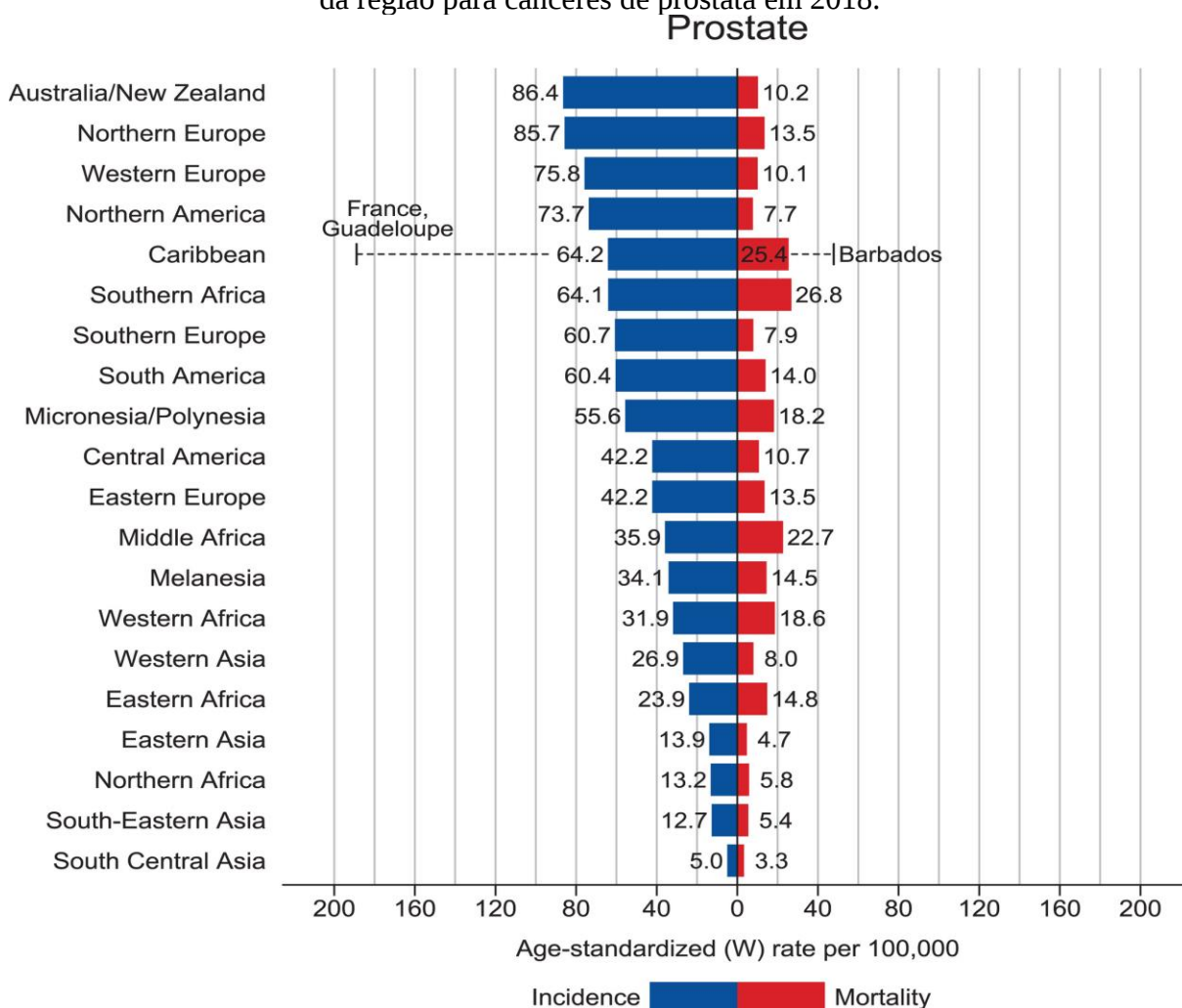
Nas últimas décadas tem sido observado um aumento da incidência do câncer de próstata, fato que pode estar relacionado ao diagnóstico do câncer latente, e a realização do teste de PSA (Antígeno Prostático Específico) em indivíduos assintomáticos, onde a disponibilidade comercial deste tipo de teste tem favorecido a detecção e diagnóstico precoce da doença em diferentes países (KVALE et al, 2019; ZHOU et al, 2016).

Devido à fatores ligados ao diagnóstico precoce, melhor tratamento oferecido aos doentes e aumento na sobrevida de homens com a doença, observa-se uma diminuição nas taxas de mortalidade em alguns países da América do Norte, Oceania, Europa do Norte e Europa Ocidental, Estados Unidos e países desenvolvidos da Ásia (CENTER et al, 2012; BRAY; WONG et al, 2016). Entretanto, o mesmo não ocorre em vários países da América Central, do Sul e Ásia que apresentam taxas crescentes de mortalidade, podendo estas,

estarem relacionadas ao estilo de vida mais ocidental associados a dificuldades de acesso a diagnóstico e tratamento (BRAY, KIEMENEY,2017; CENTER et al, 2012).

Baseados nas estimativas globais de incidência e mortalidade resultantes de diferentes tipos de câncer Bray et al (2018) descrevem na figura 3 as taxas padronizadas por idade de incidência e mortalidade específicas da região para câncer de próstata no ano de 2018, as taxas são mostradas em ordem decrescente da taxa padronizada por idade do mundo (W) e as taxas mais altas nacionalmente padronizadas por idade para incidência e mortalidade são sobrepostas.

Figura 3 – Grafico das taxas padronizadas por idade de incidência e mortalidade específicas da região para cânceres de próstata em 2018.



. Fonte: GLOBOCAN In: Bray et al (2018).

No Brasil de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA,2018), órgão do Ministério da Saúde responsável pela prevenção e controle do câncer no Brasil, o CP constitui o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens (atrás apenas do câncer de pele não-

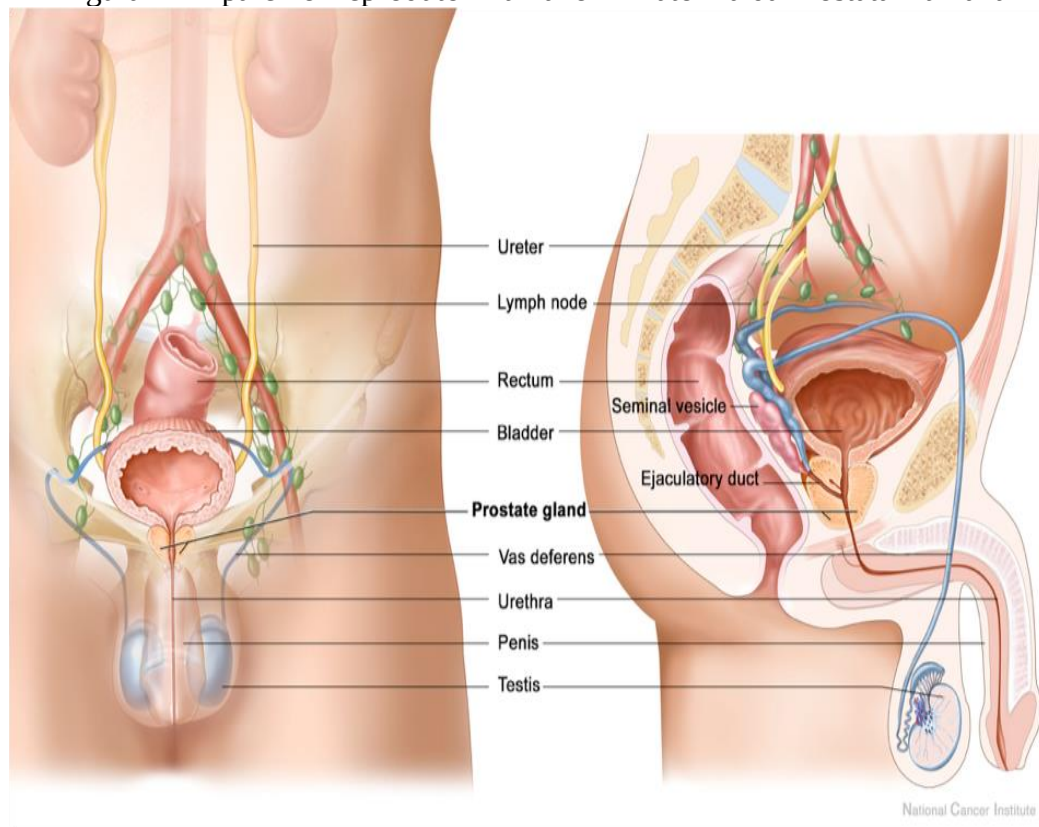
melanoma). Para o biênio 2018-2019 foram estimados 68.220 casos novos de câncer de próstata para cada ano. Esses valores correspondem a um risco estimado de 66,12 casos novos a cada 100 mil homens, o câncer de próstata é o mais incidente entre os homens em todas as Regiões do país, com 96,85/100 mil na Região Sul, 69,83/100 mil Região na Sudeste, 66,75/100 mil na Região Centro-Oeste, 56,17/100 mil na Região Nordeste e 29,41/100 mil na Região Norte (BRASIL; 2017).

2.3 ANATOMIA DA PRÓSTATA HUMANA

A próstata possui importante função sexual e urinária, sendo comum seu aumento com a idade, é dividida em tecido muscular e glandular com ductos que vão para a porção prostática da uretra. É uma glândula estritamente masculina, pequena, localizada abaixo da bexiga e à frente do reto (parte final do intestino grosso), engloba a porção inicial da uretra, tubo pelo qual a urina armazenada na bexiga é eliminada, tendo a função de produzir sêmen, líquido espesso que contém os espermatozoides, liberado durante o ato sexual (LOPEZ, 2013).

Anatomicamente, de acordo com a figura 4 a próstata situa-se na pelve verdadeira, separada anteriormente da sínfise púbica pelo espaço retropúbico (Retzius). A superfície posterior da próstata está afastada da ampola retal pela fáscia de Denonvilliers. A base da próstata tem continuidade no colo da bexiga e o ápice repousa sobre a superfície superior do diafragma urogenital, lateralmente, a próstata se relaciona com a musculatura elevadora do ânus. Sua irrigação sanguínea arterial é derivada de ramos da artéria ilíaca interna (artéria vesical inferior e retal média), a drenagem venosa se faz através do complexo venoso dorsal, que recebe a veia dorsal profunda do pênis e ramos vesicais, antes de drenar nas veias ilíacas internas. A inervação provém do plexo pélvico. A próstata normal mede 3 a 4 cm na base, 4 a 6 cm na sua dimensão céfalo-caudal e 2 a 3 cm na sua dimensão ântero-posterior (TANAGHO, MCANINCH, 2007)

Figura 4 – Aparelho Reprodutor Humano - Anatomia da Prostata Humana

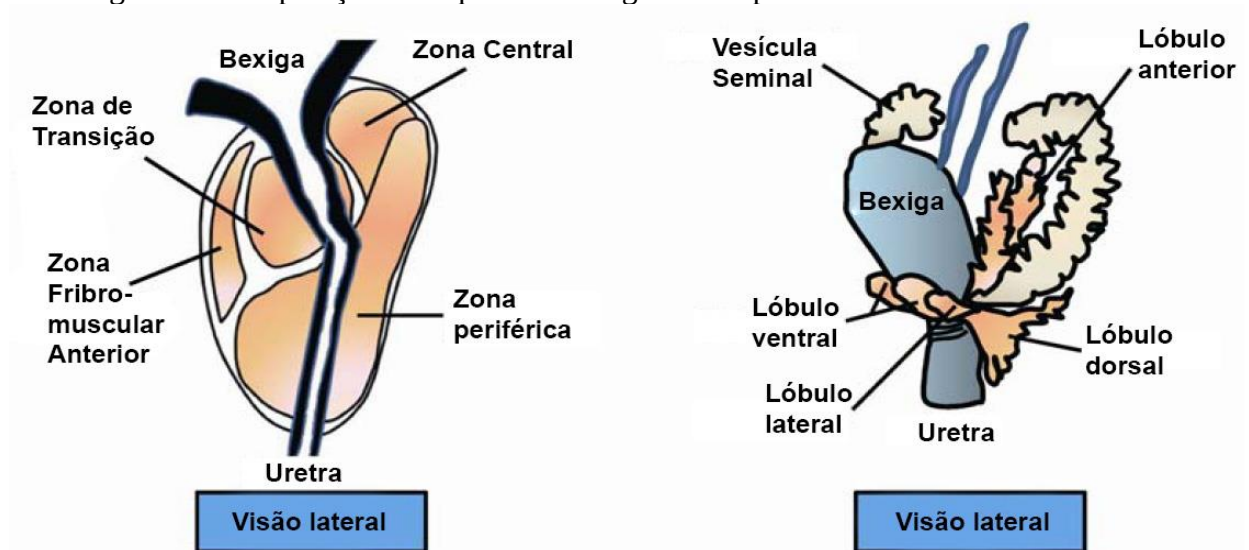


Fonte: National Cancer institute, 2005 Terese Winslow

Segundo Lee et al (2001) o crescimento da próstata é regulado por uma complexa interação entre o epitélio e estroma prostáticos, ocorre de forma mais acentuada durante a adolescência, crescendo cerca de 1,6 grama ao ano, podendo atingir na idade adulta o peso aproximado de 20 gramas. Na fase adulta (chamada de fase de manutenção) a proliferação da célula prostática ocorre em uma taxa diária de 1 a 2%, equilibrada por igual taxa de morte celular programada, sendo este um dos fatores apontados como uma das causas para o desenvolvimento da hiperplasia prostática benigna (HPB) (KYPRIANOU,2003; SHARIAT et al, 2005).

Já na figura 5 a próstata de camundongos se apresenta segmentada em estruturas designadas lobulo anterior, ventral e lateral. De acordo com Lee, et al (2001) as características das estruturas são histológicas e fisiologicamente distintas. Comparativamente a próstata anterior de camundongos é considerada análoga a zona central da próstata de humanos e a região dorsolateral da glândula de camundongos é a mais semelhante a zona de transição da próstata humana.

Figura 5 - Comparação da arquitetura das glândulas prostáticas humanas e murinas

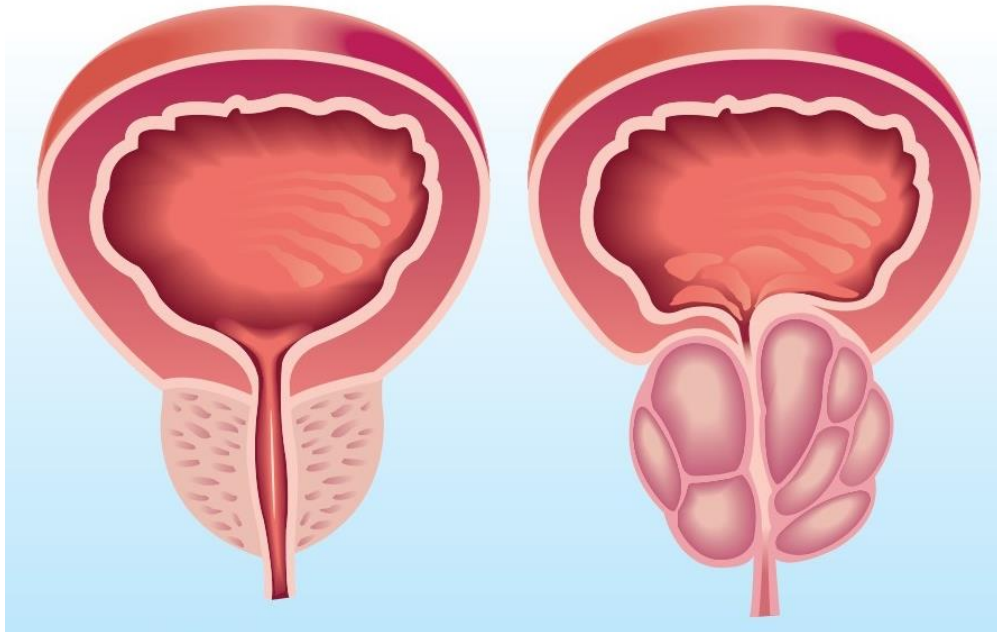


Fonte: Adaptado de Jijing Luo, Xiaoqi Liu Polo-like kinase 1, on the rise from cell cycle regulation to prostate cancer development (2012)

2.4 NEOPLASIAS DA PRÓSTATA

A hiperplasia prostática benigna (HPB) (figura 6) representa importante alteração que afeta a próstata do homem adulto, é considerado um processo hiperplásico resultante do aumento no número de células que apresenta um padrão de crescimento nodular composto de quantidades variáveis de estroma e epitélio e, de acordo com a literatura é o tumor benigno mais comum entre homens, e responsável por causar sintomas do trato urinário em pacientes acima de 40 anos, tem seu risco de desenvolvimento significativamente aumentado com a idade (DORNAS, DAMIÃO, CARRERETTE, 2010).

Figura 6 – Representação esquemática de Hiperplasia Benigna de Próstata



Fonte: Adaptado de tuasaude.com

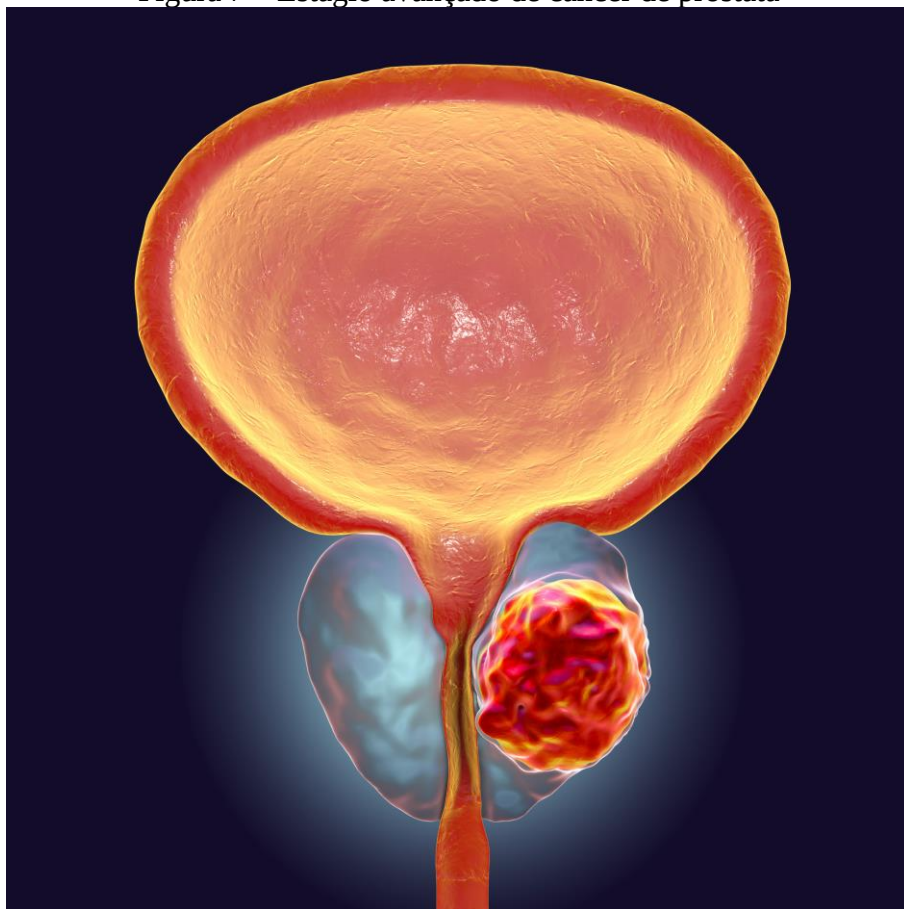
Dados referentes ao CP, evidenciam que cerca de três quartos dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos de idade, sendo considerado como o tipo de câncer mais prevalente em homens principalmente em idades mais avançadas. A mortalidade por câncer de próstata é relativamente baixa, o que reflete, em parte, seu bom prognóstico quando diagnosticado e tratado oportunamente. A sobrevida média mundial estimada em cinco anos é de 58%. Nos países desenvolvidos, essa sobrevida passa para 76% e nos países em desenvolvimento 45% (BRASIL, 2010).

Apesar dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de próstata ainda não serem muito claros, dentre eles destacam-se a idade avançada, origem étnica - maior incidência em negros e origem hereditária. Os sinais e sintomas da doença no início costuma ser assintomático, podendo apresentar sintomas semelhantes a hiperplasia benigna da próstata (aumento no número de micções, dificuldade para urinar), já na fase mais avançada da doença pode provocar dor óssea, infecção generalizada e insuficiência renal (SOCIETY OF UROLOGIC NURSES, 2020).

Com relação a caracterização histológica mais de 95% dos cânceres da próstata são adenocarcinomas. Dos outros 5%, 90% são carcinomas de células de transição e os restantes são carcinomas neuroendócrinos ou sarcomas (KYPRIANOU, ISAACS, 1989).

Segundo a Sociedade Brasileira de Urologia (SBU,2017), mesmo com a diminuição significativa em relação a incidência da doença ocorrida nas últimas décadas em decorrência das políticas de rastreamento e controle da doença, bem como do aumento da conscientização da população masculina, cerca de 20% dos casos são diagnosticados em estágios avançados (figura 7) e, apesar de todos os avanços terapêuticos, cerca de 25% dos pacientes com câncer de próstata ainda morrem devido a doença.

Figura 7 – Estágio avançado de câncer de próstata



Fonte: genengnews.com/news/potential-metastatic-prostate-cancer-biomarker-identified

2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE CÂNCER

Existem vários modelos animais que são valiosos para que os pesquisadores possam estudar os aspectos relacionados a biologia do câncer. Neste contexto o uso de modelos animais tem o potencial de aumentar nossa compreensão acerca da carcinogênese, da biologia do tumor, e o impacto de eventos moleculares específicos na biologia tumoral. No entanto, é importante o pesquisador tem em mente que nenhum modelo animal é capaz de reproduzir

com fidelidade todos os aspectos da doença humana (JOHNSON, FLEET, 2013; GRABOWSKA et al, 2014; CLOHESSY & PANDOLFI, 2015).

Os estudos baseavam diretamente no conceito de vigilância imunológica, ou seja, com o advento das tecnologias de supressão ('knockout'), este conceito pôde ser evidenciado em camundongos e humanos, onde os modelos tumorais murinos de surgimento espontâneos ou quimicamente induzidos têm sido úteis na demonstração de que o sistema imunológico vigia constantemente o aparecimento de células aberrantes. E desta forma, desempenham um papel fundamental na prevenção da formação de tumores, por meio da utilização de linfoma T murino os autores conseguiram desvendar as funções de determinadas células do sistema imune na vigilância imunológica contra tumores (DUNN, OLD, SCHREIBER, 2004; LUCHS e PANTALEÃO, 2010; SENGUPTA et al, 2010).

O camundongo de laboratório ("*Mus musculus*") é considerado um dos melhores sistemas de modelos para investigações de câncer devido a vários fatores, incluindo o seu pequeno tamanho e propensão a se reproduzir em cativeiro, a vida útil de três anos, extensas semelhanças fisiológicas e moleculares para humanos e um genoma inteiramente seqüenciado (PARK et al, 2010; ITTMANN et al, 2013; GRABOWSKA et al, 2014; CLOHESSY & PANDOLFI, 2015).

Segundo Shen (2010), os modelos transplantáveis (xenográficos e singênico) são os mais utilizados, pois, possibilitam um estudo melhor das metástases e reproduzem com maior facilidade o microambiente tumoral, favorecendo o modelamento dos experimentos e possibilitando diversas abordagens, esses modelos são desenvolvidos em camundongos imunodeficientes como por exemplo os NUDE.

De qualquer forma, os modelos transplantáveis em camundongos apresentam as condições essenciais como: alta taxas de enxerto de todas as etapas da doença, associação entre tecidos maligno e tecido benigno adjacente, reproduzem a heterogeneidade tumoral e perfis genéticos e reproduzem o estado hormonal do tumor humano, além de que possibilitam o uso de linhagens celulares de câncer humano ou de tecidos de câncer primário humano, modelos transplantáveis xenográficos (ITTMANN et al, 2013; LIN, et al, 2014).

De acordo com Lin et al, (2014), dentre as características específicas e de acordo com o local de inoculação, existem vantagens e desvantagens para os modelos murinos de câncer,

isto é, na inoculação subcutânea de células de câncer as vantagens são: fácil implantação e fácil monitoramento do tumor, e as desvantagens: baixo fornecimento de nutrientes e baixa taxa de desenvolvimento, sendo difícil nestas condições ter um câncer em estado avançado. Já nos modelos de inoculação ortotópico, isto é, no próprio órgão original das células a serem inoculadas, as vantagens são: ter um microambiente semelhante ao do câncer original e promoção de metástases espontâneas, já as desvantagens se estabelecem pela difícil implantação, a baixa taxa de desenvolvimento tumoral e limitado desenvolvimento do câncer. De outra forma, as inoculações em capsula sub-renal (SRC) de modelos experimentais murinos tem vantagem de ter provisão sanguínea boa e uma maior taxa de desenvolvimento do tumor, assim como maior heterogeneidade, sendo a difícil implantação uma desvantagem (WONG et al, 2016).

2. 6 . AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUIMICA

Segundo daleck, 2016, objetivo principal do exame histopatológico na oncologia é constatar se o crescimento de células é de fato neoplásico e, conseqüentemente se a neoplasia é , maligna ou benigna, assim sendo, várias lesões podem simular a neoplasia e, o exame histopatológico é o único meio de diferencia-las, sendo que as alterações podem ser de hiperplasia, regeneração, displasia ou inflamação e, de forma acurada devem ser avaliadas na diferenciação histopatológica.

A combinação da imunologia e da histoquímica, a imuno-histoquímica é utilizada para identificar os chamados marcadores tumorais, que geralmente são proteínas filamentosas presentes no citoesqueleto de células normais e sem seus correspondentes neoplásicos. Pelo método de avidina-biotina-peroxidase os filamentos intermediários são identificados por anticorpos monoclonais e policlonais e, evidenciados histoquimicamente (DALECK, 2016)

O uso do Ki-67 (antígeno nuclear de células proliferativas) possibilita a quantificação de células em proliferação, por estar expresso nas fases G1, S e G2 do ciclo celular, com pico durante a mitose e ausente nas células em repouso (fase G0), e ainda possibilita o acompanhamento tumoral de maneira simplificada, rápida e de baixo custo (ARISAWA et al., 1999; BUITRAGO et al., 2011).

2.7. MODELOS EXPERIMENTAIS DE CÂNCER DE PRÓSTATA

Uma grande limitação no estudo do CP foi a falta de modelos animais adequados que recapitulam fielmente todas as etapas da progressão da doença (NAVONE et al., 1999). O NCI Mouse Models of Human Cancers Consortium convocou um grupo de patologistas humanos e veterinários para analisar os modelos animais atuais de câncer de próstata humano (PC) e fazer recomendações sobre a análise patológica desses modelos. Mais de 40 modelos diferentes com 439 amostras foram revisadas, incluindo modelos de ratos geneticamente modificados, xenoenxerto e modelos caninos. Relatando que numerosos modelos relevantes foram desenvolvidos nos últimos 15 anos e cada abordagem têm pontos fortes e fracos (ITTMANN et al. 2013).

De acordo com Ittmann et al (2013) há mais de 15 anos, a primeira geração de modelos de câncer de próstata geneticamente modificados foi introduzido, esses modelos transgênicos utilizavam promotores específicos da próstata para expressar oncogênese SV40 no epitélio da próstata. Os modelos animais particularmente, modelos de ratos, desempenharam um papel central no estudo da etiologia, prevenção e tratamento do CP. Da mesma forma, os modelos de cultura de tecidos são extremamente úteis na compreensão da biologia do CP mas, não recapitulam as complexas interações celulares dentro do microambiente tumoral, que desempenham um papel fundamental na iniciação e na progressão do câncer.

O desenvolvimento de modelos melhorados de CP acelerou nossa compreensão da complexidade biológica e promete melhorar o desenvolvimento de novas abordagens de prevenção, detecção e tratamento desta malignidade comum (ITTMANN et al. 2013; GRABOWSKA et al, 2014; LIN, et al, 2014; HUANG et al, 2016).

Pavese et al (2013), demonstrou um modelo de implantação ortotópica de CP. Neste modelo, as células são implantadas diretamente no lobo ventral da próstata em camundongos Balb/c e podem progredir por 4-6 semanas. Este modelo fornece uma imagem da capacidade das células de invadir e escapar do órgão primário, entrar e sobreviver no sistema circulatório e se implantar e crescer em um local secundário.

Como a morte por CP não se deve ao tumor primário, mas sim a formação de metástases distintas, a capacidade de modelar efetivamente esta progressão pré-clínica é de

alto valor, com isso modelos como o utilizado por Pavese et al (2013) tem sido usado efetivamente para medir a resposta metastática a ambas as mudanças na proteína em expressão, bem como a resposta à terapêutica de pequenas moléculas, em um curto período de resposta.

Devido à complexidade molecular do câncer e ao custo da terapia, os pesquisadores ainda procuraram características genômicas funcionais *in vivo* para embasar o atendimento ao paciente. Os modelos de câncer muitas vezes recapitulam fielmente a biologia básica, o microambiente tumoral e suas interações, respostas de drogas e resistência terapêutica semelhante à doença humana e, por efetivamente favorecem de forma ampla a busca de respostas com relação ao CP (LUCHS e PANTALEÃO, 2010; HUANG et al, 2016).

Os modelos transplantáveis xenográficos ou xenotransplantáveis possibilitam o uso de linhagens celulares de câncer humano assim como, o uso de tecidos de câncer primário humano. Assim sendo, os modelos clássicos para câncer de próstata humano consistem em camundongos imunodeficientes que carregam xenoenxerto de linha celular de câncer de próstata subcutâneo gerados por injeção de células de câncer de próstata cultivadas (por exemplo, LNCaP, PC-03 ou DU145) ou co-injeção de células de CP cultivadas e células estromais (LIN, et al, 2014; HUANG et al, 2016).

De acordo com Pagliaro (2013) a linha celular PC-03 está entre as formas mais resistentes do câncer de próstata e, ao serem incubadas manifestaram variada resistência a terapia. Desta forma, avaliou-se a curva de crescimento celular das células PC-03 e, durante um período de incubação *in vitro* e, pós-tratamento, observou-se a formação de colônias 21 dias após o início do tratamento, questionando-se assim, a origem desta resistência e também a variabilidade da curva de crescimento das células PC-03.

De acordo com Lopez (2013) o desenvolvimento do novo modelo animal é crucial para melhor entender a biologia das metástases ósseas do CP, investigar novas opções terapêuticas e assim fornecer uma reprodução confiável da situação clínica dos tumores, permitindo caracterizar e projetar tratamentos eficazes, compreendendo os mecanismos moleculares de metástase óssea do CP.

2.9 USO DE DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS EM ESTUDOS EXPERIMENTAIS DE CÂNCER

De forma geral, a caracterização da resposta imune ao câncer, se mapeia pelos ramos celular e humoral da resposta imune, particularmente pelo envolvimento dos linfócitos e anticorpos e, outros elementos. Os componentes da resposta imune incluem diferentes subgrupos de linfócitos (células T auxiliares, células T citotóxicas, células T reguladoras), células B e células natural killer (NK) e, células apresentadoras de antígenos (APC), que incluem os monócitos sanguíneos, macrófagos teciduais e células dendríticas (CD). A comunicação dos diferentes componentes do sistema imune ocorre via interação célula-célula mediada por diversas moléculas de adesão e receptores existentes na superfície celular e nas citocinas. As citocinas podem ser imuno-estimulantes ou imuno inibitórias da resposta de acordo com a existência de receptores específicos na circulação (REDMAN e CHANG, 2009).

De acordo com Redman e Chang, (2009), a existência de mecanismos de imunovigilância que previnem que o câncer se desenvolva, é sustentada pelos achados de que indivíduos imunodeficientes e pacientes que utilizam tratamento prolongado com fármacos imunossupressores apresentem alto risco de desenvolvimento de câncer, O que experimentalmente foi evidenciado, quando camundongos imunizados rejeitaram tumores singênicos quimicamente induzidos. Pesquisas com animais imunodeficientes tem sido realizada em diferentes áreas de estudo, entre elas as áreas da imunologia e parasitologia, a utilização de medicamentos com ação imunossupressora vem sendo usada experimentalmente para a obtenção de camundongos imunossuprimidos, tornando assim estes animais um importante modelo biológico (PEREIRA et al 2008).

De acordo com Goodman e Gilman (2003) citado por Bavaresco et al (2005) em bases farmacológicas da terapêutica, os glicocorticoides são definidos “como hormônios esteroides, sintetizados no córtex da glândula adrenal que afetam o mecanismo dos carboidratos e reduzem a resposta inflamatória”, em que a sua síntese e liberação ocorrem naturalmente pelo organismo animal e, sua concentração é mediada por mecanismos diversos. Os glicocorticoides de maneira geral, apresentam vários efeitos e são utilizados principalmente pelos seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores (BAVARESCO et al, 2005).

O efeito supressor da dexametasona (Dx) é relatado quando da inibição de interleucina 4 nos gliomas tendo com resultado que a Dx por si só não modifica significativamente a letalidade do tumor mas, tem uma relevância no efeito inibitório dos gliomas (BENEDETTI et al, 2005) e, também, é relatado a inibição dos capilares formadores de gliomas, em um efeito anti-angiogênico *in vivo*, e pela diminuição do aporte nutricional e pela falta de oxigenação diminuir a viabilidade dos gliomas (BAVARESCO, et al, 2005)

A Dx é um glicocorticóide amplamente utilizado por suas propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias, possuindo atividade linfopênica, especialmente quanto à produção de linfócitos T. A Dx pode induzir apoptose em diferentes células do sistema imunológico, incluindo os precursores de linfócitos T e B imaturos e linfócitos T maduros. Esse glicocorticóide também inibe a transcrição de importantes genes de citocinas como a interleucina 2 (IL-2) e o interferon-gama (IFN- α), que são essenciais para a proliferação de linfócitos T (LILLELGHANIAN et al., 2002).

A ciclosporina A (CsA) tem as suas propriedades imunossupressoras demonstradas desde o início da década de 70 e desde este período tem sido utilizada nos transplantes de órgãos e no tratamento de doenças inflamatórias de vários órgãos, é peptídio derivado de um fungo conhecido como *Tolypocladium inflatum* *gams* (SANTAMARIA et al., 2012).

A CsA possui potente propriedade imunossupressora, refletidas na sua capacidade de bloquear a transcrição de genes de citocinas (IL-2 e IL-4) de células T ativadas. A CsA exerce seletivamente o seu efeito numa população restrita de células linfoides e poupa as demais células de linhagem mieloide, de forma a atingir a ação imunossupressora seletivamente (MATSUDA; KOYASY, 2000).

De acordo com Pereira, et al (2008), foi evidente a imunossupressão da CsA principalmente pela redução evidente de linfócitos T CD3+, em compartimento celular circulante. Da mesma forma, foi observado que os linfócitos B CD19+ reduziram, refletindo em uma significativa diminuição da resposta humoral.

A ciclofosfamida (Cy) é um derivado químico da mostarda nitrogenada mecloretamina e, é um dos agentes alquilantes mais amplamente utilizados tanto na oncologia humana como na veterinária. É uma agente presente em vários protocolos de tratamento de neoplasias, principalmente em protocolos de poliquimioterapia, como nos casos de linfomas,

leucemias e em diversos sarcomas e carcinomas (DALEKE, C.R., 2016). A Cy é um potente imunossupressor e inibe tanto a resposta imune celular como humoral, agindo em células com alta atividade mitótica (PEREIRA et al, 2008). Pereira et al, (2008) verificou a diminuição das populações de linfócitos T e B circulantes, revelando resultados homogêneos na redução progressiva de linfócitos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um modelo de tumor ortotópico de próstata humano xenotransplantado em camundongos imunossuprimidos

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o desenvolvimento tumoral com imunossupressão dos camundongos utilizando a dexametasona (Dx).
- b) Avaliar o desenvolvimento tumoral com imunossupressão dos camundongos utilizando ciclosporina (CsA).
- c) Avaliar o desenvolvimento tumoral com imunossupressão dos camundongos utilizando ciclofosfamida (CY).
- d) Avaliar histologicamente as amostras de camundongos controle (C0) e camundongos imunossuprimidos com Dexametasona (Dx), Ciclosporina (CsA) e Ciclofosfamida (Cy).
- e) Avaliar o biomarcador Ki-67 por Imunohistoquímica nas amostras de camundongos do grupo controle (C0) e dos camundongos dos grupos imunossuprimidos com Dexametasona (Dx), Ciclosporina (CsA) e Ciclofosfamida (Cy).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foram protocolados na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMS (CEUA -UFMS), tendo recebido aprovação com número 946/2018

4.2 Tipo de pesquisa

Trata-se de um estudo experimental em modelo animal.

4.3 Local da pesquisa

O estudo experimental foi realizado no Laboratório de Carcinogênese em parceria com o Laboratório de Estudos em Modelos Experimentais de Doenças da faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), no município de Campo Grande – MS.

4.4. Cultura Celular e Preparação de Células para Inoculação

Para realização deste trabalho foram utilizadas linhagens de células neoplásicas PC-03 (ATCC CRL 1435, carcinoma de próstata) provenientes do Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares da UFMS.

As células armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C), foram descongeladas em banho-maria a 37°C e transferidas para um tubo cônico de 15ml, contendo 9mL de meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute), contendo os antibióticos Penicilina e Estreptomicina (1%) e Soro Fetal Bovino (SFB) (10%).

O tubo com as células foi centrifugado por 4 minutos a 1000 rpm, posteriormente o sobrenadante foi aspirado, restando o pellet de células, que foi ressuspensionado em 3 mL de meio. Após homogeneização esta suspensão de células foi transferida para frascos de cultura de 75 cm³ e incubados a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até apresentar uma monocamada com aproximadamente 80% de confluência.

Uma vez obtido esta confluência, as células foram removidas do fundo do frasco com a adição de 0,5 ml de tripsina-EDTA (0,25% + EDTA 1 *nM*) em tampão PBS, pH 7,4. A suspensão de células foi transferida para outro tubo cônico de 15 mL contendo meio completo (meio, antibióticos e SFB a 10%), em um volume 3 vezes maior do que aquele usado de tripsina a fim de neutralizar a mesma e após centrifugação por 4 minutos a 1000 RPM (Rotações Por Minuto), aspirou-se o sobrenadante, restando somente o pellet, que foi ressuspenso em meio completo. Este procedimento foi repetido até que obtenção de massa celular suficiente para o experimento, inoculação das células na próstata do animal. Após, procedeu-se à contagem de células viáveis com trypan blue em câmara de newbauer para inoculação nos camundongos, a suspensão de células foi preparada de modo a conter 5×10^5 /0,1 ml de PBS para cada animal.

As células para a inoculação foram obtidas a partir da cultura celular. Foram isoladas 500.000 (5×10^5) células de CP em seguida foram ressuspendidas em 0,1 ml de solução PBS (phosphate-buffered saline) salina estéril que, acondicionadas em seringa de insulina com agulha 40X08 21G 1/2, sendo mantidas em gelo até o momento da inoculação.

4.5. Animais

Foram utilizados 40 camundongos (*Mus musculus* – Hairless) machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (dimensão 40x35x17 cm), na quantidade de cinco animais/gaiola, à temperatura de aproximadamente 25°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (NUVITAL® CR1) e água previamente esterilizadas *ad libitum*. Os mesmos foram aclimatados às condições do laboratório durante cinco dias antes do experimento.

4.6. Tratamento

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 10 animais cada, conforme descrito abaixo.

Grupo 1 – Controle (CO): Os animais foram tratados apenas com o veículo do fármaco (IP), e inoculados com células do tumor de próstata.

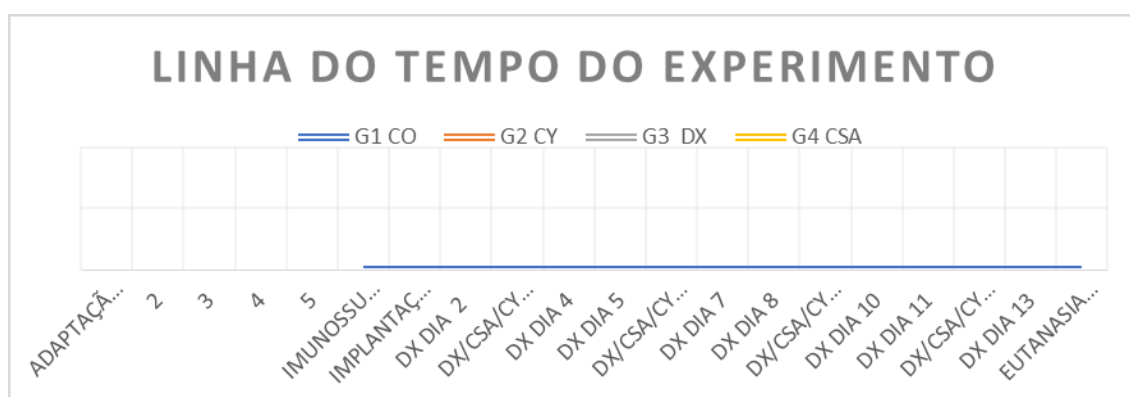
Grupo 2 – Ciclofosfamida (CY): Os animais foram inoculados células de tumor de próstata e receberam doses semanais de 75 mg/Kg de ciclofosmamida (IP) com intervalos de no mínimo 72 horas

Grupo 3 – Dexametasona (DX): Os animais foram inoculados com células do tumor de próstata e receberam doses diárias de 5 mg/Kg de dexametasona (IP).

Grupo 4 – Ciclosporina (CsA): Os animais foram inoculados com células do tumor de próstata e receberam 10 mg/Kg de ciclosporina (IP) 3 vezes por semana.

O tratamento com os fármacos imunossupressores teve duração de 14 dias do início da imunossupressão até a eutanásia dos animais, como mostra a figura 8.

Figura 8 - Linha do tempo demonstrativo do experimento

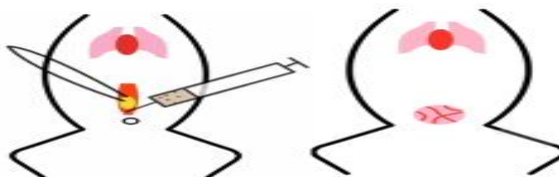


Modelo Ortotópico de Tumor de Próstata Humano

Este modelo foi realizado de acordo com o proposto por Pavese et al (2013)(figura 9). Que preconiza a Implantação Ortotópica de células tumorais da próstata humana. O animal foi colocado em na câmara de Isoflurano até que estivesse completamente anestesiado e, mantido em anestesia inalatória. O animal foi colocado em um campo cirúrgico estéril mantendo um cone de Isoflurano no nariz para manutenção anestésica.

Após desinfecção da pele do animal, utilizando um bisturi estéril, foi realizada uma incisão abdominal baixa de cerca de 3-4 mm. Localizado a bexiga e identificado o lóbulo ventral da próstata onde foram injetados os 0,1 mL da solução celular previamente preparada a 5×10^5 células. Em seguida foi realizado a sutura da camada muscular e da camada de pele.

Figura 9 - Demonstração esquemática da implantação do tumor



Fonte: Pavese et al (2013)

4.7. Monitoramento dos Animais

Para o controle da dor foram administrados medicamento com efeito analgésico 4h após a cirurgia e mantidos de 12 em 12h nas próximas 48h. Os pontos foram removidos entre 7 e 10 dias após a cirurgia, uma vez que a ferida estivesse cicatrizada. Os animais foram monitorados e observados continuamente durante a aplicação dos medicamentos imunossupressores quanto a evolução da imunossupressão e tumoral pelo exame clínico e palpação abdominal dos camundongos, com uma frequência diária até o término do experimento.

4.8. Eutanásia

No 14º dia após a indução tumoral, todos os 40 animais foram submetidos a eutanásia com sobre dose anestésica letal (3 x a dose anestésica), por injeção única intraperitoneal de Xilazina 60 mg/Kg e Quetamina 300 mg/Kg (Volume total variando entre 2 -3,5 ml), seguida de exsanguinação e, imediatamente após a eutanásia, suas próstatas e anexos foram removidos para análises histológicas e imuno-histoquímicas posteriores.

4.9. Procedimento de necrópsia

A Necrópsia foi realizada após 14º dias da inoculação. Com o animal anestesiado, foram removidos o aparelho urinário e anexos com o tumor da próstata transferidos para um cassete em formol a 10%, para encaminhamento e realização de exame histopatológico e imuno-histoquímica no Laboratório de Carcinogênese Experimental da UFMS.

4.10. Processamento do material prostático para exame histopatológico

A próstata coletada foi colocada sobre uma placa de polipropileno branca, e imediatamente, foram pincelados com uma solução de formalina tamponada a 10%. Assim que foram enrijecidos e, os fragmentos de tecido prostático foram acondicionados em frascos plásticos transparentes e individuais e guardados em caixa de papelão e ao abrigo da luz, para posterior análise histopatológica.

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo na espessura de 5 µm e montado sobre lâmina de vidro coberta por lamínula e, em seguida foram coradas em hematoxilina-eosina e, encaminhadas para análise histopatológica.

4.11. Expressão Imunohistoquímica do biomarcador Ki-67.

As lâminas foram desparafinizadas em xileno, reidratadas em alcoóis decrescentes e lavadas em água corrente e água destilada.

As lâminas foram incubadas em tampão Tris-EDTA pH 9.0 para recuperação antigênica. Sendo em seguida levadas ao forno de micro-ondas, potência máxima (900W), por 20 minutos, deixando esfriar em seguida. Após, foram incubadas com peróxido de hidrogênio 3% por 10 minutos, lavadas em água destilada, incubadas por mais 10 minutos com bloqueador de proteínas, lavadas com tampão. Incubadas por 30 minutos com anticorpo primário (Anti-Ki-67 anti-humano) (diluição 1:400), lavadas com tampão. Em seguida incubadas com o polímero-HRP universal (EasyLink One) por 18 minutos e reveladas com DAB (diaminobenzidina) por 5 minutos; após lavagens, as lâminas foram coradas com hematoxilina, azuladas com água amoniacal e incubadas em concentrações crescentes de álcool sendo montadas em meio de montagem.

E as imagens a partir das lâminas de imuno-histoquímica foram captadas utilizando um microscópio (Marca Nikon®, modelo Elipse E200) com lente triocular e acoplado a uma câmera de vídeo conectada a um microcomputador.

4.12. Análise histopatológica das lâminas

Os aspectos histopatológicos considerados para fins de análise estatística nesse estudo foram divididos nos 4 grupos estudados de acordo com o seu aspecto histopatológico e seu escore de variabilidade.

Aspecto histopatológico

- hiperplasia
- degeneração
- inflamação
- neoplasia

Escore de variabilidade

- (0) ausente
- (1) leve 25%
- (2) moderado 50%
- (3) intenso 75%
- (4) exuberante 100%

4.13. Análise de dados

A avaliação da associação dos grupos experimentais e suas alterações histológicas e o escore dos aspectos histológicos foram avaliados de forma descritiva nas tabelas apresentadas assim, como a imunossupressão das drogas nos grupos estudados.

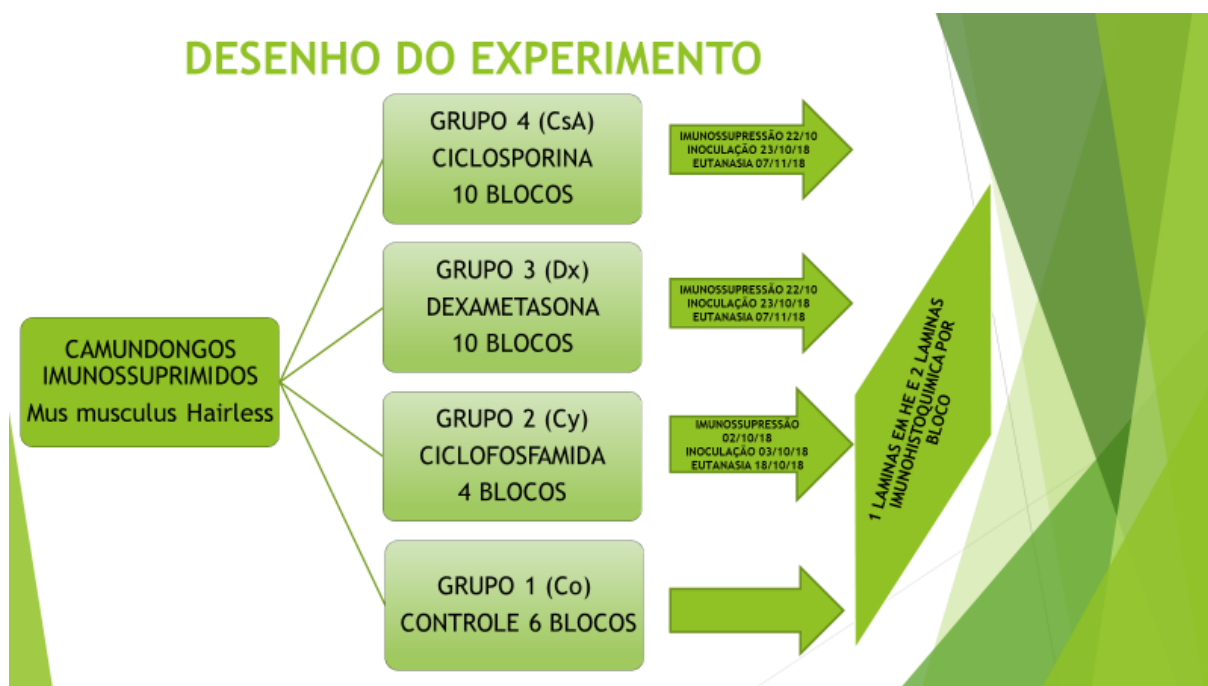
5 RESULTADOS

5.1 Avaliação Histopatológica

Avaliação dos animais imunossuprimidos pela ciclofosfamida, dexametasona e ciclosporina de acordo com os achados histopatológicos e seus respectivos escores de intensidade. Os achados histopatológicos foram nomeados por: hiperplasia, neoplasia, degeneração e inflamação. Os escores de intensidade dos achados foram definidos pelo patologista e variaram, de acordo com a observação, de 0: Ausente; 1: Leve (25%); 2: Moderado (50%); 3: Intenso (75%) e 4 Exuberante (100%).

O desenho (figura 10) abaixo resume como o experimento se desenvolveu e, evoluiu na produção das lâminas de microscopia para o histopatológico e a imunohistoquímica do material prostático coletado dos animais imunossuprimidos farmacologicamente por ciclofosfamida, dexametasona e ciclosporina

Figura 10 – Desenho do experimento de acordo com a evolução dos processos no experimento.



O resultado das alterações histopatológicas de cada grupo avaliado, são demonstradas na tabela 1. As alterações variaram de acordo com o patologista e, foram classificadas como hiperplasia, neoplasia, degeneração e inflamação. Estas alterações foram classificadas como leve, moderada, intensa, exuberante e, como ausente e presente. Os grupos experimentais tiveram um n(número) de 30 animais, com a seguinte distribuição: G1= 6, G2=4, G3=10, G4=10.

Tabela 1 : Resultados das alterações histológicas, em cada um dos grupos experimentais avaliados

Alterações histológicas	Grupo experimental			
	G1	G2	G3	G4
	Co (n=6)	Cy (n=4)	Dx (n=10)	CsA (n=10)
Hiperplasia leve	50 (3)	50 (2)	50 (5)	30 (3)
Hiperplasia Moderada	33,3 (2)	25 (1)	50 (5)	40 (4)
Hiperplasia Intensa	0	0	0	30 (3)

Continuação...	0	0	0	0
Hiperplasia Exuberante				
Neoplasia	17,7 (1)	0	0	10 (1)
Degeneração Leve	50 (3)	0	40 (4)	60 (6)
Degeneração Moderada	33,3 (2)	75 (3)	40 (4)	40 (4)
Degeneração Intensa	0	0	20 (2)	0
Degeneração Exuberante	0	0	0	0
Inflamação Leve	0	0	10 (1)	20 (2)
Inflamação Moderada	0	0	0	0
Inflamação Intensa	0	0	0	0
Inflamação Exuberante	0	0	0	0

Os resultados estão apresentados em frequência relativa (frequência absoluta).

Dos animais do grupo controle (Co) foram encaminhados 6 blocos parafinados para análise histopatológica e, na análise das lâminas 1 (uma) delas apresentou desenvolvimento de neoplasia e não ocorreu aspecto inflamatório, sendo que as características de degeneração e hiperplasia (figura 11 e 12) foram evidenciadas de forma leve e moderada.

Figura 11 – Fotomicrografia das secções histológicas de grupo Controle (Co) exibindo ácinos com precipitação proteica (asteriscos) e hiperplasia prostática (cabeça de setas). Coloração de HE. Aumento de 10X

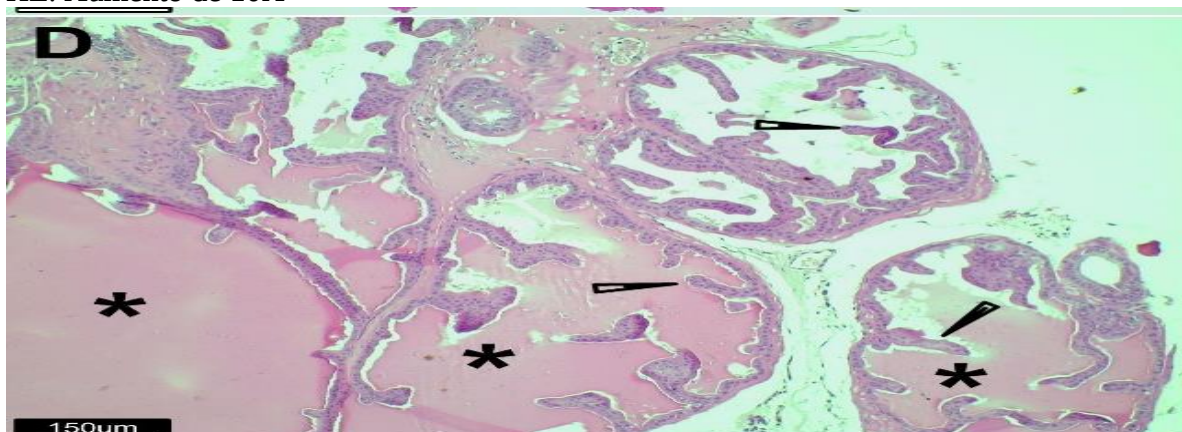
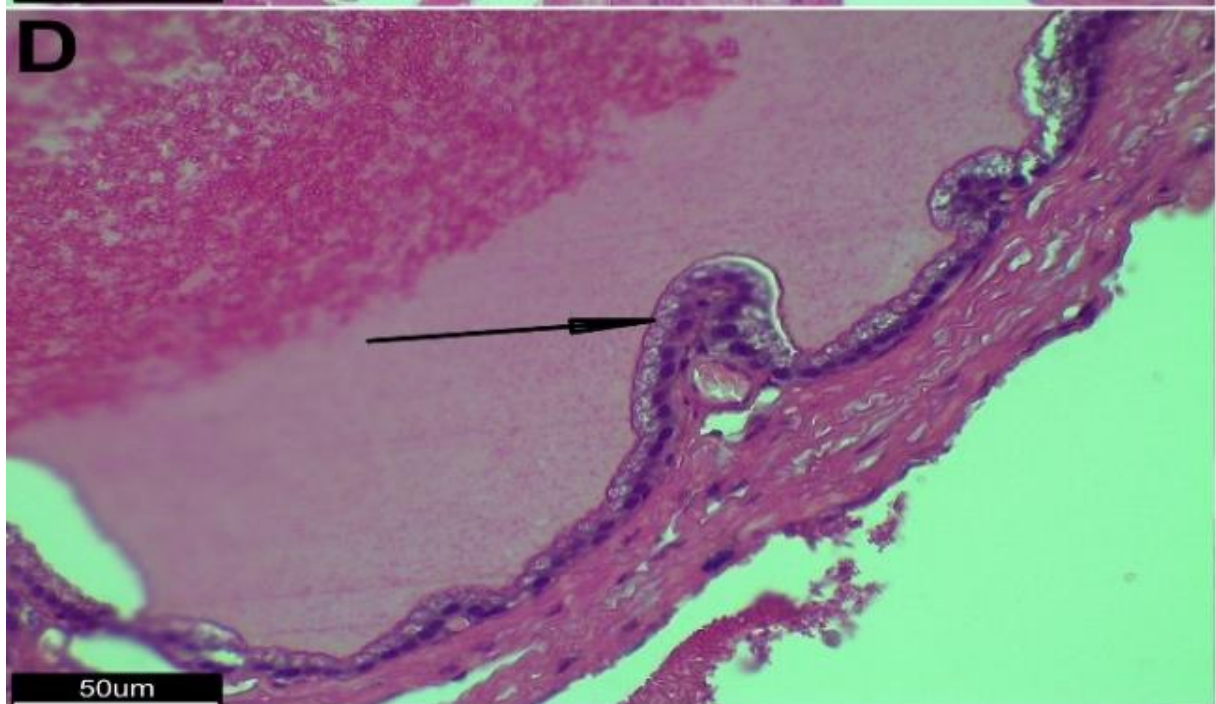


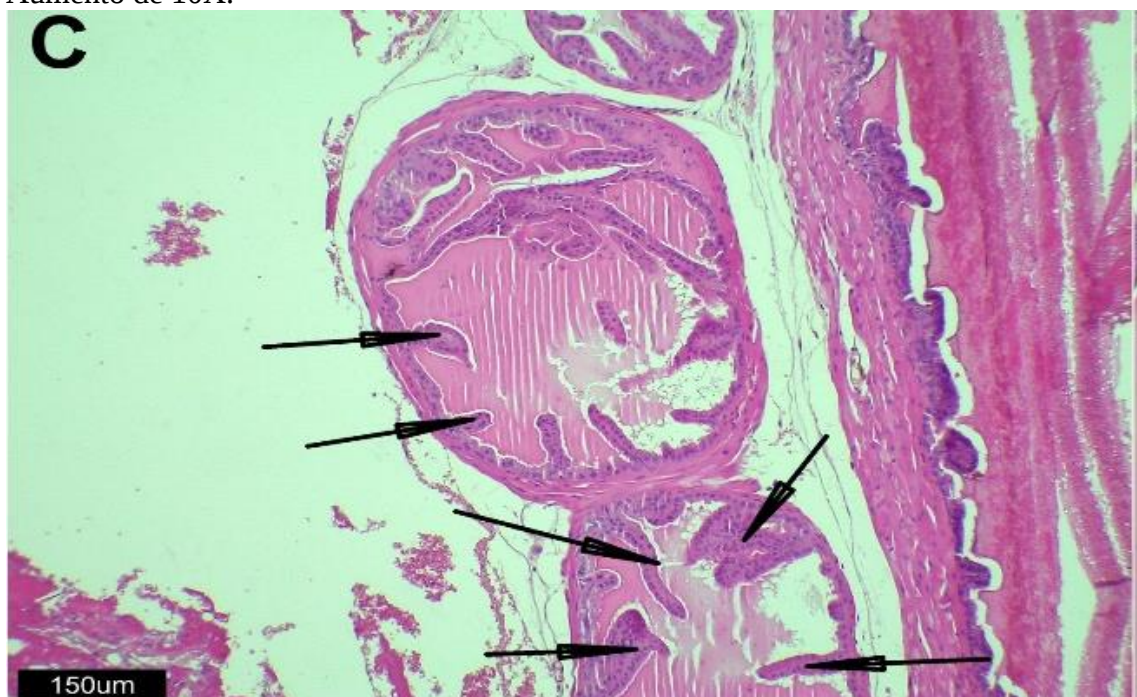
Figura 12 – Fotomicrografia das secções histológicas de grupo Controle (Co) exibindo ácino com hiperplasia (setas). Coloração de HE. Aumento de 40X.



Dos animais imunossuprimidos com ciclofosfamida (Cy) foram encaminhados 3 blocos parafinados para análise histopatológica e, na análise das lâminas nenhum deles desenvolveu neoplasia e inflamação. Sendo que as características de degeneração foram evidenciadas de forma moderada em todas as lâminas e, as características de hiperplasia leve (figura 13) na maioria das lâminas.

Ocorreram 50% de hiperplasia leve e 25% de hiperplasia moderada e, 75% das características de degeneração foram descritas como moderada. Não ocorreram características inflamatórias e nem de neoplasia.

Figura 13 – Fotomicrografia da secção histológica de próstata de camundongo de grupo Ciclofosfamida (Cy) exibindo ácinos com áreas de hiperplasia (setas). Coloração de HE. Aumento de 10X.



Dos animais imunossuprimidos com dexametasona (Dx) foram encaminhados 10 blocos parafinados para análise histopatológica e, na análise nenhum deles desenvolveu neoplasia e 1 deles observou-se processo inflamatório (figura 15 e 14)) . Com relação a hiperplasia e a degeneração observou-se variável escore.

Dos 10 animais imunossuprimidos com dexametasona 50% dos animais apresentaram lesão hiperplásica leve e 50% lesão hiperplásica moderada, 40 % dos animais apresentaram lesão degenerativa leve, 40% lesão degenerativa moderada e 20% lesão degenerativa intensa. Com relação a inflamação observou-se que 10% dos animais apresentou inflamação leve. Com relação a presença de neoplasia o grupo de animais imunossuprimidos com dexametasona apresentou ausência de células neoplásicas.

Figura 14 – Fotomicrografia da secção histológica de próstata de camundongo de grupo Dexametasona (Dx) exibindo área de infiltrado inflamatório mononuclear difusamente distribuído (quadrado). Coloração de HE. Aumento de 10X

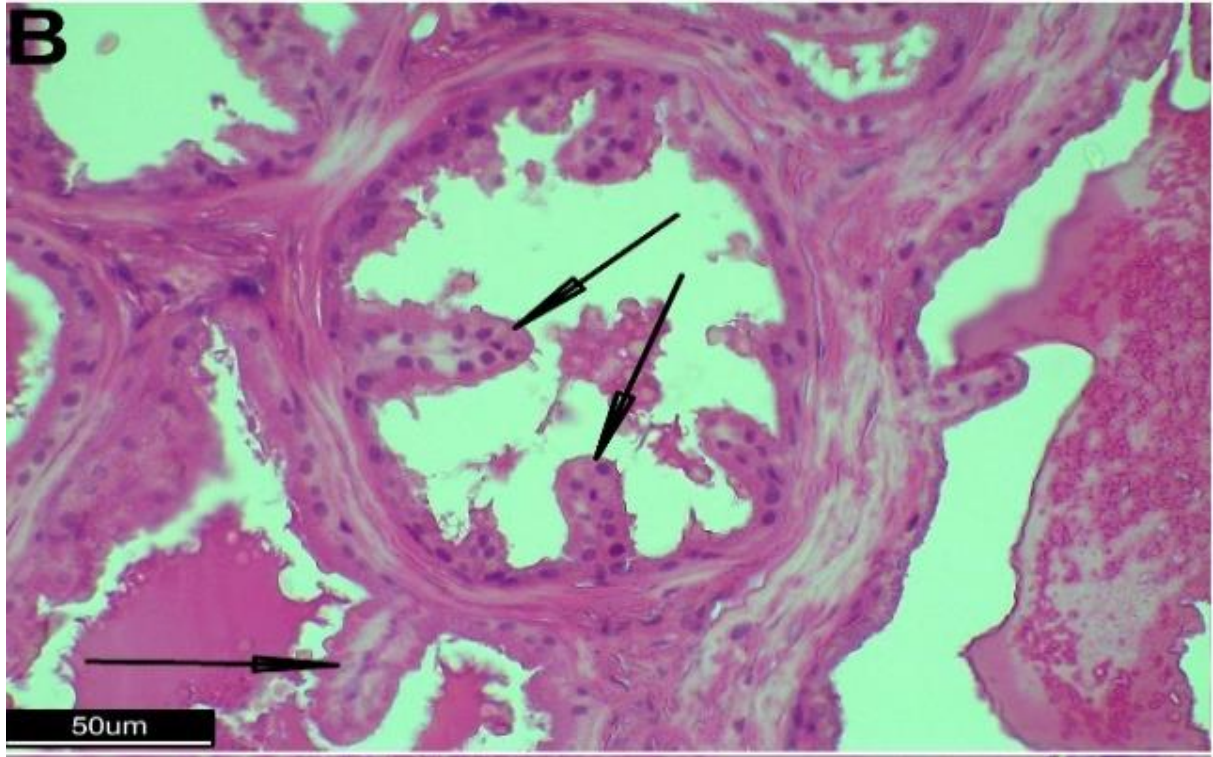
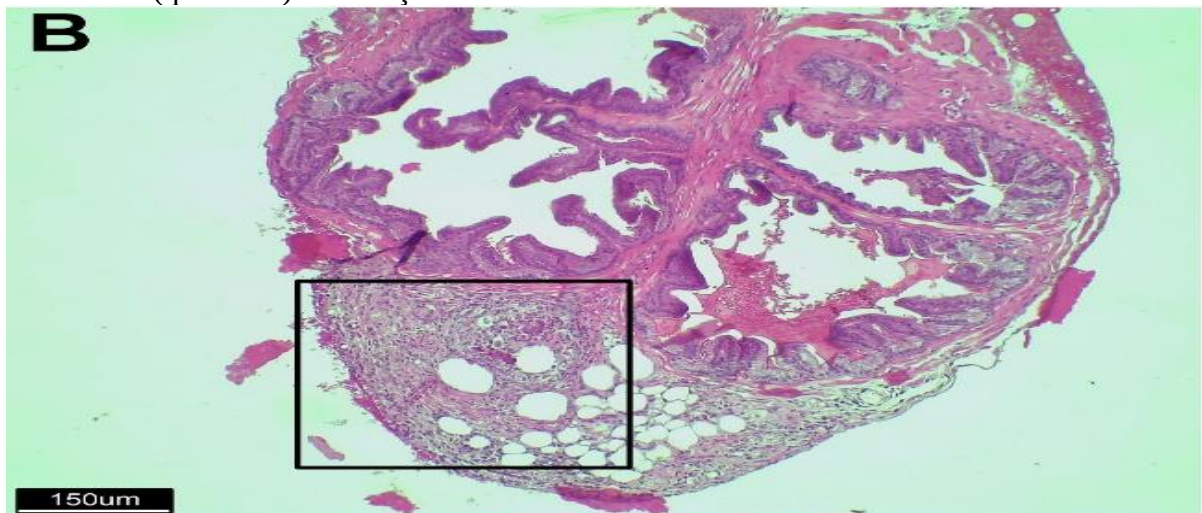


Figura 15 – Fotomicrografia da secção histológica de próstata de camundongo de grupo Dexametasona (Dx) exibindo área de infiltrado inflamatório mononuclear difusamente distribuído (quadrado). Coloração de HE. Aumento de 40X.



Dos animais imunossuprimidos com ciclosporina (CsA) foram encaminhados 10 blocos parafinados para análise histopatológica e, na análise 1 (um) deles desenvolveu neoplasia (figura 16) e 2 (dois) deles observou-se processo inflamatório. Com relação a hiperplasia e a degeneração observou-se variável escore.

Das lesões hiperplásicas 30% foram leves e 40% foram moderadas, sendo que 30% tiveram aspecto intenso. Das aspecto de degeneração 60% foram leve e 40% foram moderadas e do aspecto inflamação 20% leve, neste grupo observou-se um animal com neoplasia.

Figura 16 – Fotomicrografia da secção histológica de próstata de camundongo de grupo Ciclosporina (CYa) exibindo em área de neoplasia glandular maligna (circulo). Coloração de HE. Aumento de 10X

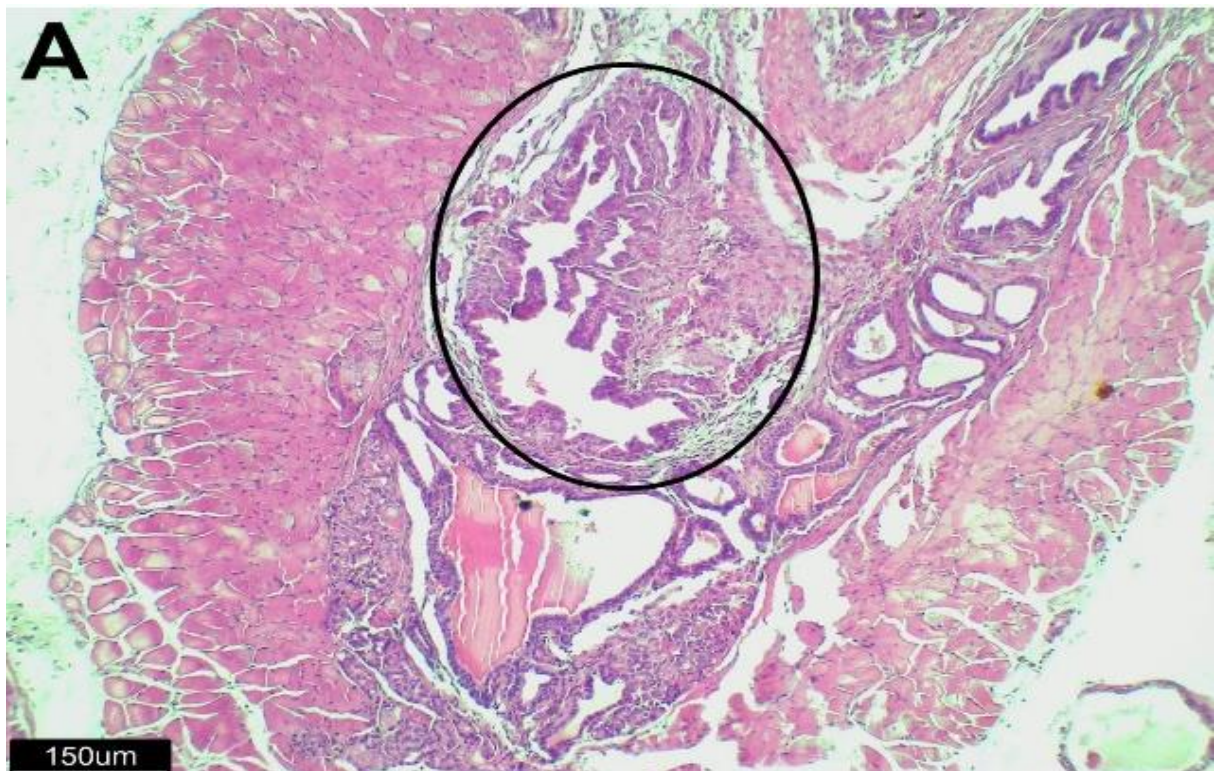
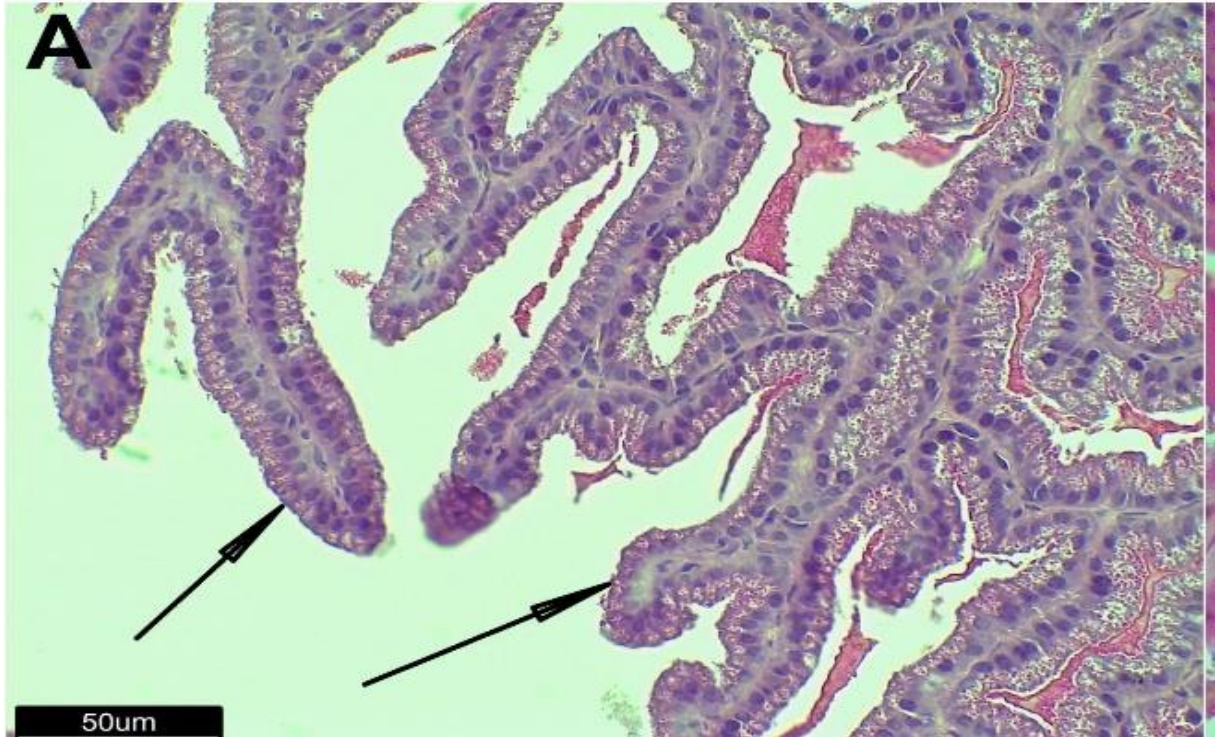


Figura 17 – Fotomicrografia da secção histológica de próstata de camundongo de grupo Ciclosporina (CYa) exibindo ácino com hiperplasia (setas). Coloração de HE. Aumento de 40X



5.2 Avaliação Imuno-histoquímica

A avaliação da expressão Imuno-histoquímica do biomarcador Ki-67 de células humanas em divisão celular, realizada no corte histológico das próstatas dos animais dos grupos G1, G2, G3 e G4 não demonstrou expressão do biomarcador em nenhuma célula analisada, que pudesse configurar um crescimento de linhagem celular humana PC-03 nos referidos animais, não sendo identificado tumor de próstata humano nas próstatas de camundongos.

6. DISCUSSÃO

Inúmeros esforços foram empregados nas últimas décadas para a compreensão do processo de tumorigênese, onde vários modelos animais foram desenvolvidos, visando elucidar diversas questões referentes ao câncer *in vivo*. A utilização de camundongos como instrumento de estudos biológicos ocorre de modo intenso, principalmente nas áreas de imunologia, oncologia e genética. Essa prática ocorre por diversas razões, dentre elas, o fato das linhagens de camundongos serem altamente padronizadas, possuírem características conhecidas e monitoradas após várias gerações, além do fato de compartilharem similaridades genéticas e fisiológicas com os humanos, permitindo que múltiplas características da doença sejam estudadas nestes modelos (Huang et al., 2016; Clohessy e Pandolfi, 2015; Grabowska et al., 2014; Banyard et al., 2013; Ittmann et al., 2013).

Existem critérios fundamentais para que um modelo tumoral murino possa ser utilizado no esclarecimento da tumorigênese: origem e progressão clonal do tumor; evidências da progressão tumoral; patologia e histologia tumoral semelhantes à doença em humanos; possibilidade de estudar aspectos de invasão tecidual e o papel da resposta imune contra tumores; padrões de expressão gênica e a possibilidade de estudo de terapias antitumorais (Ittmann et al., 2013; Irshad e Abate-Shen, 2013).

Segundo Luchs e Pantaleão (2010) os modelos murinos caracterizam métodos poderosos para elucidar os mecanismos subjacentes à progressão tumoral e a metástase, além de permitir o desenvolvimento de drogas específicas para o tratamento de pacientes com câncer e se apoiando nestes argumentos e nos citados nos parágrafos anteriores que se estabeleceu o presente estudo propôs desenvolver um modelo experimental de câncer de próstata em camundongo humano que nos permitisse o estudo do desenvolvimento tumoral, bem como suas interações com seu microambiente.

O camundongo Hairless é um camundongo sem pelos devido a um gene recessivo autossômico, situado no cromossomo 14. Sendo essa mutação identificada originalmente em um camundongo capturado em um aviário de Londres. Os Animais homozigotos nascem com pelagem normal, mas após 10 dias o pelo começa a cair, podendo voltar a crescer em pequenos tufo que logo caem, permanecendo sem pelos por toda a vida, não apresentando deficiências imunológicas severas como as encontradas no camundongo nude. A sua baixa resposta imunológica se deve à deficiência de células T helper, (ANDRADE, 2002).

Os linfócitos T helper podem ser classificados em células Th1 e células Th2. De acordo com os estímulos recebidos linfócitos Th1, secretam interferon- γ , fator de crescimento transformador beta, TNF α e IL-2, que colaboram com a função citotóxica dos linfócitos CD8⁺, induzem a autorregulação do processamento de antígeno nos proteossomas, induzem a expressão MHC de classe I e II e podem induzir outros antígenos relacionados a células neoplásicas. Os linfócitos Th1 também aumentam a resposta imune anti-tumor estimulando a ativação de macrófagos (BALKWILL, MANTOVANI, 2001; DeNARDO, COUSSENS, 2007).

É amplamente conhecido que as células T CD4⁺ possuem um papel diferencial no desenvolvimento tumoral e que as células Th1 podem reprimir o crescimento tumoral secretando IFN- γ e apoiando a atividade de linfócitos T citotóxicos. (SPITet al., 2018; SPINNER et al., 2019).

Como observado acima, apesar de não indicarem uma verdadeira imunodeficiência, à ausência de células T helper no camundongo *Harless* poderia favorecer o desenvolvimento do CP e, com isso, possibilitar uma maior taxa de positividade no modelo, o que não foi evidenciado em nosso estudo onde não foi observado a presença de células PC3 humanas nas próstatas dos animais analisado. Tal achado pode indicar que devido a resposta imune do hospedeiro as células inoculadas foram neutralizadas e eliminadas.

A dexametasona (Dx) se mostra uma droga fortemente supressora frente a resposta imune celular tendo seu efeito direcionada a população de linfócitos T. sendo demonstrada uma diminuição significativa dos linfócitos T circulantes em especial no 14 dia do início do tratamento. A Dx também demonstra uma diminuição significativa dos linfócitos B CD19⁺ (LILL-ELAGHANIAN et al., 2002; PEREIRA et al. 2008).

A imunossupressão de CsA promove uma redução dos linfócitos TCD3⁺ em 14 dias e, uma redução dos linfócitos B CD19⁺ aos 7 e 14 dias de tratamento, com um aumento aos 28 dias. Na análise histopatológica do baço de animais imunossuprimidos com CsA se observa uma discreta redução celular da polpa branca do baço (PEREIRA, et al. 2008)

A imunossupressão com Cy demonstra uma diminuição do linfócito T e B circulantes em um período experimental de 28 dias, evidenciando uma redução progressiva mais homogênea destes linfócitos (PEREIRA, et al, 2008).

Portanto, o efeito imunossupressor dos três fármacos, Cy, Dx e CsA fica evidenciado pela redução dos números totais de Linfócitos circulantes (PEREIRA, et al., 2008); como relatado anteriormente a baixa resposta imunológica dos camundongos *Hairless* se deve a deficiência das células T helper e os mesmos podem ser classificados em células Th1 e Th2 onde os Th1 aumentam a resposta imune anti-tumor estimulando a ativação de macrófagos. Assim sendo, era esperado que no presente estudo utilizando as três drogas imunossupressoras obteríamos uma diminuição destas populações de linfócitos, criando uma condição ideal ao desenvolvimento tumoral humano nos animais inoculados. Fato este, que não foi observado em nosso experimento.

A inflamação é o mecanismo natural para reparar e restaurar um dano tecidual, onde as plaquetas direcionadas ao local liberam Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF), com a função de recrutar as células do sistema imune que irão produzir mediadores químicos como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, leucotrienos entre outros, enfatizando que o excesso dessas substâncias acarreta o bloqueio da apoptose (Barreto et al., 2011). Como tumores espontâneos de próstata são raros em camundongos, as alterações histopatológicas encontradas neste estudo podem sugerir que o desenvolvimento de tumor de próstata em camundongos nos grupos Co e CsA, além de alterações hiperplásicas e degenerações nos quatro grupos estudados são, muito possivelmente, devido a uma resposta ao estresse oxidativo sofrido pela próstata dos animais em virtude de uma boa resposta inflamatória à inoculação das células humanas (PC-03).

7. CONCLUSÃO

Nos animais submetidos a imunossupressão por dexametasona, ciclosporina e ciclofosfamida não apresentaram desenvolvimento tumoral de células PC3 (Células tumorais prostáticas humanas).

Foram observados nos grupos controle e ciclosporina a presença de neoplasia de próstata de camundongos e diversas alterações histológicas compatíveis com hiperplasia e degeneração prostática o que define que as alterações provocadas nos animais do experimento favoreceram um ambiente próprio para as alterações na próstata murina.

8. REFERÊNCIAS

ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6.

AMERICAN CÂNCER SOCIETY. [Internet]. 2015. Disponível em: <https://www.cancer.org/es/investigacion/datos-y-estadisticas-sobre-el-cancer-entre-los-hispanos.html>. Acesso em: 10 de dez 2019.

ARAÚJO, J. S., CONCEIÇÃO, V.M., ZAGO, M. M. F. Masculinidades transitórias no adoecimento pelo câncer de próstata. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, v. 27, n. 3224, p.1-9, Dez 2019

ARISAWA, E. A. L., MORAES, E. PCNA and Ki-67 cell-cyclemakers: A brief review. *Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos*, v.2, n.1, p. 54-60, jan./jun., 1999.

BANYARD, J., CHUNG, I., WILSON, A.M., VETTER, G., LE BE´CHEC., BIELENBERG, D.R., ZETTER, B.R. Regulation of epithelial plasticity by miR-424 and miR-200 in a new prostate cancer metastasis model. *Scientific Reports*.v. 3, n.1, p.3151 (1-12), Nov 2013.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and câncer: back to Virchow. *The Lancet*. v. 357, p 539-545. Feb. 2001.

BARRETO, R.C., PEREIRA, G.A.S., COSTA, J.L., CAVALCANTI, H. R. B. O Duplo Papel da Inflamação no Surgimento das Lesões Cancerígenas. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*.v.14, n. 4, p. 107-114, 2011.

BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; WINK, M. R.; BATTASTINI, A. M. O. Dexamethasone inhibits proliferation and stimulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 activity in C6 rat glioma cell line. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 84, n. 1, p. 1-8, Aug. 2007.

BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.M.O. Glicocorticóides: Usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. *Infarma*, v.17, n.7/9, p. 58-60, Set, 2005.

BENEDETTI, S.; PIROLA, B.; POLIANI, P. L.; CAJOLA, L.; POLLO, B.; BAGNATI, R.; MAGRASSI, L.; TUNICI, P.; FINOCCHIARO, G. Dexamethasone inhibits the anti-tumor effect of interleukin 4 on rat experimental gliomas. *Gene Therapy*, v. 10, n. 2, p. 188-192, Jan. 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer (INCA). *Estimativa 2018/2019*. 2018. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>. Acesso 26 nov 2019.

BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil* – Rio de Janeiro: INCA, p. 1-130, 2017.

BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil - Rio de Janeiro: INCA, p. 1-100, 2010.

BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer. Tipos de câncer: Câncer de próstata. Rio de Janeiro: INCA; 2019.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 68, n. 6, p. 394–424, Nov. 2018.

Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.3322/caac.21492>

BRAY, F.; PINEROS, M. Cancer patterns, trends and projections in Latin America and the Caribbean: a global context. Salud Publica Mexico, v. 58, n. 2, p. 104-117, Mar. 2016.

BRAY, F.; KIEMENEY, L. A. Epidemiology of prostate cancer in Europe: Patterns, trends and determinants. Management of Prostate Cancer, p. 1-27, Jan. 2017.

BUITRAGO, F.; UEMURA, G.; SENA, M.C.F. Prognostic factors in breast câncer. Com. Ciências Saúde - 22 Sup 1:S69-S82, 2011.

CENTER, M. M.; JEMAL, A.; LORTET-TIEULENT, J.; WARD, E.; FERLAY, J.; BRAWLEY, O.; BRAY, F.; International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. European Urology, v. 61, n. 6, p. 1079-1092, June 2012.

CLOHESSY, J.G AND PANDOLFI, P.P. Mouse hospital and co-clinical trial project—from bench to bedside. Nat. Rev. Clin. Oncol. v.12, p. 491–498, August 2015.

DALECK, C.R., DE NARDI, A.B. Oncologia Em Cães e Gatos - 2ª Ed. Rio de Janeiro: Roca; 2016.

De NARDO, D.G.; COUSSENS, L.M. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast câncer progression. Breast Cancer Research. v.9, n.4, p.2012-222. 2007.

DORNAS, M. C.; DAMIÃO, R.; CARRERETTE, F. B. Tratamento Contemporâneo não cirúrgico da hiperplasia prostática benigna. Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ. v. 9, 2010.

DUNN, G.P., OLD, L.J., SCHREIBER, R.D. The immunobiology of câncer immunosurveillance and immunoediting. Immunity, v.21, n. 2, p. 137-48, 2004.

FERLAY, J., COLOMBET, M., SOERJOMATARAM. I., et al. Global and Regional Estimates of the Incidence and Mortality for 38 Cancers: GLOBOCAN 2018. Lyon: International Agency for Research on Cancer/World Health Organization; 2018.

GRABOWSKA, M.M., DEGRAFF, D.J., YU, X., JIN, R.J., CHEN, Z., BOROWSKY, A.D., MATUSIK, R.J. Mouse Models of Prostate Cancer: Picking the Best Model for the Question. Cancer Metastasis Rev. v.33, n. 0, p. 377–397, September 2014.

GUERRA, M.R., GALLO, C.V.M., MENDONÇA, G.A.S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Rev. Brasileira de Cancerologia*, v. 5, n.3, p. 227-234. Maio 2005.

GLOBOCAN 2018. Disponível em: <https://www.iccp-portal.org/news/globocan-2018>

HUANG, Y., CHENG, C., ZHANG, C., ZHANG, Y., CHEN, M., STRAND, D.W., JIANG, M. Advances in prostate cancer research models: From transgenic mice to tumor xenografting models. *Asian Journal of Urology*, v. 3, n.2, p. 64-74, April 2016.

IRSHAD, S. e ABATE-SHEN, C. Modeling prostate cancer in mice: something old, something new, something premalignant, something metastatic. *Cancer Metastasis Rev* v.32, p. 109–122, 2013.

ITTMANN, M.; HUANG, J.; RADAELLI, E.; MARTIN, P.; SIGNORETTI, S.; SULLIVAN, S.; SIMONS, B. W.; WARD, J. M.; ROBINSON, B. D.; CHU, G. C.; LODA, M.; THOMAS, G.; BOROWSKY, A.; CARDIFF, R. D. Animal Models of Human Prostate Cancer: The Consensus Report of the New York Meeting of the Mouse Models of Human Cancers Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Research*, v. 73, n. 9, p. 2718-2736, May 2013.

JAMES, L.J., WONG, G., CRAIG, J.C., HANSON, C.S., JU, A., HOWARD, K. Men's perspectives of prostate cancer screening: A systematic review of qualitative studies. *PLoS One*, v.12, n.11, p. 1-23, 2017.

JOHNSON, R.L., FLEET, J.C. Animal Models of corectal Cancer. *Cancer Metastasis Rev*, v.32, n. 0, p. 39-67, 2013.

KYPRIANOU, N. Doxazosin and terazosin suppress prostate growth by inducing apoptosis: Clinical significance. *The Journal of Urology*, v. 169, n. 4, p. 1520–1525, Apr. 2003.

KYPRIANOU, N.; ISAACS, J. T. Expression of transforming growth factor-beta in the rat ventral prostate during castration-induced programmed cell death. *Molecular Endocrinology*, v. 3, n. 10, p. 1515-1522, Oct. 1989.

KVÅLE, R.; AUVINEN, A.; ADAMI, H-O.; KLINT, A.; HERNES, E.; MØLLER, B.; PUKKALA, E.; STORM, H. H.; TRYGGVADOTTIR, L.; TRETTLI, S.; WAHLQVIST, R.; WEIDERPASS, E.; BRAY, F. Interpreting Trends in Prostate Cancer Incidence and Mortality in the Five Nordic Countries. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 99, n. 24, p. 1881-1887, Dec. 2019.

LEE, C.; COCKETT, A.; CUSSENOT, O.; GRIFFITHS, K.; ISAACS, W.; SCHALKEN, J. Regulation of prostate growth. In: *Proceedings of the Fifth International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia*. Edited by C. Chatelain, L. Denis, K.T. Foo, S. Khoury, and J. McConnell. United Kingdom: Health Publications Ltd., v. 3, n. 79, p. 81-106, 2001.

LILL-ELGHANIAN, D.; SCHWARTZ, K.; KING, L.; FRAKER, P. Glucocorticoid-induced apoptosis in early B cells from human bone marrow. *Experimental Biology and Medicine*, v. 277, n. 9, p. 763-770, Oct. 2002.

LIN,D., XUE, H., WANG,Y., WU,R., WATAHIKI, A., DONG, X., CHENG,H., WYATT, A.W., COLLINS, C.C., GOUT, P.W., WANG, Y. Next generation patient-derived prostate cancer xenograft models. *Asian J Androl*, v. 16, n. 3, p. 407-412, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4023366/>

LOPEZ, M. G. Experimental models of prostate cancer bone metastasis - Establishment, characterization and imaging of xenograft bone metastasis models – Tesis Doctorals. Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Barcelona , 2013.

LUO, J.; LIU, X.; Polo-like kinase 1, on the rise from cell cycle regulation to prostate cancer development. *Protein Cell*. v.3, n.3, p.182–197, fev 2012.

LUCHS, A. e PANTALEÃO, C. Apoptosis and in vivo models to study the molecules related to this phenomenon. *Einstein* [online]. vol.8, n.4, pp.495-497.Oct 2010.

MATSUDA, S.; KOYASU, S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology*, v. 47. N. 2-3, p. 119-125, May 2000.

MCANINCH, J. W.; TANAGHO, E. A. *Urologia Geral de Smith- 16ª Ed.- Barueri, SP: Editora Manole, 2007. p406-414.*

MENDONÇA, G.A.S. Câncer na população feminina brasileira. *Rev. Saúde Pública*, v. 27, n.1, p.68-75, 1993.

NAVONE, N.M, LABATE, M.E, TRONCOSO, P., PISTERS, C.L., ESCHENBACH, A. C.V., LOGOTHETIS, C. J. p53 mutations in prostate cancer bone metastases suggest that selected p53 mutants in the primary site define foci with metastatic potential. *Jornal de Urologia*, v. 161, Edição 1, p. 304-308, 1999.

NUNES, M. V., TAJARA, E. H. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. *Rev. Saúde Pública*, v.32, n. 4, p. 372-384, 1998.

PAGLIARO, S. B. O. - Cancro da Próstata: Efeitos da quimioterapia in vitro em células estaminais cancerígenas - Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; set, 2013

PARK, SI; KIMM, SJ; MCCAULEY, LK; GALLICK, GE. Pre-Clinical Mouse Models of Human Prostate Cancer and their Utility in Drug Discovery. *Curr Protoc Pharmacol*. v.1, n. 51, p. 1415–1427, December 2010.

PAVESE, J.; OGDEN, I. M.; BERGAN, R. C. An Orthotopic Murine Model of Human Prostate Cancer Metastasis. *Journal of Visualized Experiments : JOVE*, v. 2013, n. 79, p. 1-9, Sep. 2013.

PEREIRA, A.; ARAÚJO, R. S.; BRITO, R. R.; XAVIER, J. G.; BONDAN, E. F.; PEREIRA, J.; LALLO, M. L. Pharmacologically immunosuppressed mice as a model for study of

opportunistic parasite infections. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 17, n. 1, p. 292-295, set. 2008.

QUIJADA, P.D.S., FERNANDES, P. A., OLIVEIRA, D.S., SANTOS, B.M.O SANTOS. Câncer de próstata: retrato de uma realidade de pacientes em tratamento. Rev enferm UFPE, on line., v.11, (Supl. 6), p. 2490-9, 2017.

REBBECK, T. R.; DEVESA, S. S.; CHANG, B-L.; BUNKER, C. H.; CHENG, I.; COONEY, K.; EELES, R.; FERNANDEZ, P.; GIRI, V. N.; GUEYE, S. M.; HAIMAN, C. A.; HENDERSON, B. E.; HEYNS, C. F.; HU, J. J.; INGLES, S. A.; ISAACS, W.; JALLOH, M.; JOHN, E. M.; KIBEL, A. S.; KIDD, L. R.; LAYNE, P.; LEACH, R. J.; NESLUND-DUDAS, C.; OKOBIA, M. N.; OSTRANDER, E. A.; PARK, J. Y.; PATRICK, A. L.; PHELAN, C. M.; RAGIN, C.; ROBERTS, R. A.; RYBICKI, B. A.; STANFORD, J. L.; STROM, S.; THOMPSON, I. M.; WITTE, J.; XU, J.; YEBOAH, E.; HSING, A. W.; ZEIGLER-JOHNSON, C. M. Global patterns of prostate cancer incidence, aggressiveness, and mortality in men of african descent. Prostate Cancer, p. 1-12, Feb 2013.

REDMAN, B. G.; CHANG, A. E. Imunologia dos tumores. www.Medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/4584/imunologia, 2009

ROMANZINI, A.E., PEREIRA, M.G., GUILHERME, C., COLOGNA, A.J., CARVALHO, E.C. Predictors of well-being and quality of life in men who underwent radical prostatectomy: longitudinal study. Rev. Latino-Am. Enfermagem. v. 26, n. 3031, p.1-14 2018.

SANTAMARIA, J.S.; CESTARI, T.F.; SOIREFMANN, M. – Ciclosporina – Consenso Nacional de Psoríase – Sociedade Brasileira de Dermatologia, p.84, 2012

SENGUPTA, N., MACFIE, T.S., MACDONALD, T.T., PENNINGTON, D., SILVER, A.R. Cancerimmunoeditingand “spontaneous” tumor regression. Pathol Res Pract, v. 206, n.1, p. 1-8. 2010.

SHARIAT, S. F.; ASHFAQ, R.; ROEHRBORN, C. G.; SLAWIN, K. M.; LOTAN, Y. Expression of survivin and apoptotic biomarkers in benign prostatic hyperplasia. The Journal of Urology, v. 174, n. 5, p. 2046-2050, Nov. 2005.

SHEN, M.M. ABATE-SHEN C. molecular genetics of prostate câncer: new prospects for old challenges. Genes dev. v.24, n. 18, p. 1967–2000, Sep 2010.

SIEGEL, R.L., MILLER, K.D., JEMAL, A. Cancer statistics, CA Cancer J Clin, v. 68, p.7-30, 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. Rastreamento do Câncer da Próstata. Nota Oficial 2017.

SOCIETY OF UROLOGIC NURSES AND ASSOCIATES. 2020. Urologic Conference. The Premier Conference for Urology Professionals. October 9-12, 2020, Hyatt Regency New Orleans – LA.

SPINNER, C. A.; LAMSOU, I.; METAIS, A.; FEBRISSY, C.; MOOG-LUTZ, C.; LUTZ, P. G. The E3 Ubiquitin Ligase Asb2a in T Helper 2 Cells Negatively Regulates Antitumor Immunity in Colorectal Cancer. *Cancer Immunol Res.* v.7, n.8, p.1332-1344. Aug; 2019.

SPIT, M., KOO, B.K., MAURICE, M.M. Tales from the crypt: intestinal nichesignals in tissue renewal, plasticity and cancer. *Open Biol.* v.8, n.9 Sep 2018.

TANAGHO, E. A., MCANINCH, J. W. *Urologia Geral de Smith-* 16 ed.- Barueri, SP: Manole, 2007. p 406-414.

WONG, M. C. S.; GOGGINS, W. B.; WANG, H. H. X.; FUNG, F. D. H.; LEUNG, C.; WONG, S. Y. S.; NG, C. F.; SUNG, J. J. Y. Global incidence and mortality for prostate cancer: Analysis of temporal patterns and trends in 36 countries. *European Urology*, v. 70, n. 5, p. 862-874, Nov. 2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Global Action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. 2013

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Visão Global do Câncer, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Health Observatory. World Health Statistics 2018: Monitoring health for the Sustainable Development Goal, 2018.

ZHOU, C. K.; CHECK, D. P.; LORTET-TIEULENT, J.; LAVERSANNE, M.; JEMAL, A.; FERLAY, J.; BRAY, F.; COOK, M. B.; DEVESA, S. S. Prostate cancer incidence in 43 populations worldwide: An analysis of time trends overall and by age group. *International Journal of Cancer*, v. 138, n. 6, p. 1388-1400, Mar. 2016.

ZIADA, A.; ROSENBLUM, M.; CRAWFORD, E. D. Benign prostatic hyperplasia: An overview. *Urology*, v. 53: (3 Suppl 3a), p. 1-6, Mar. 1999.

9. APÊNDICES

Apêndice 1

Tabela 2 – Alterações histopatológicas do grupo Ciclosporina(CsA)

GRUPO 04	Hiperplasia	Neoplasia	Degeneração	Precipitação proteica	Inflamação
Animal 01	1	Ausente	2	2	0
Animal 02	1	Ausente	1	1	1
Animal 03	2	Ausente	2	2	0
Animal 04	3	Ausente	1	2	0
Animal 05	2	Presente	1	2	1
Animal 06	3	Ausente	1	2	0
Animal 07	2	Ausente	2	3	0
Animal 08	2	Ausente	2	3	0
Animal 09	1	Ausente	1	0	0
Animal 10	1	Ausente	1	2	0

Escore: 0: Ausente; 1: Leve (25%); 2: Moderado (50%); 3: Intenso (75%) e 4 Exuberante (100%).

Apêndice 2

Tabela 3 - Alterações histopatológica do grupo Dexametasona (Dx)

GRUPO 03	Hiperplasia	Neoplasia	Degeneração	Precipitação proteica	Inflamação
Animal 01	2	Ausente	3	3	0
Animal 02	2	Ausente	1	2	0
Animal 03	2	Ausente	1	2	0
Animal 04	2	Ausente	2	2	0
Animal 05	2	Ausente	2	2	1
Animal 06	1	Ausente	3	3	0
Animal 07	1	Ausente	2	2	0
Animal 08	1	Ausente	2	2	0
Animal 09	1	Ausente	1	1	0
Animal 10	1	Ausente	1	1	0

Apêndice 3

Tabela 4 Alterações histopatológicas do grupo Ciclofosfamida (Cy)

GRUPO 02	Hiperplasia	Neoplasia	Degeneração	Precipitação proteica	Inflamação
Animal 02	1	Ausente	2	2	0
Animal 03	1	Ausente	2	2	0
Animal 04	2	Ausente	2	2	0

Escore: 0: Ausente; 1: Leve (25%); 2: Moderado (50%); 3: Intenso (75%) e 4 Exuberante (100%).

Apêndice 4

Tabela 5 – Alterações histopatológicas do grupo Controle (Co)

GRUPO 01	Hiperplasia	Neoplasia	Degeneração	Precipitação proteica	Inflamação
Animal 01	2	Ausente	2	2	0
Animal 02	1	Ausente	2	2	0
Animal 03	1	Ausente	1	1	0
Animal 04	2	Ausente	1	1	0
Animal 05	1	Presente	1	1	0

Escore: 0: Ausente; 1: Leve (25%); 2: Moderado (50%); 3: Intenso (75%) e 4 Exuberante (100%).

10. ANEXOS

ANEXO 1

Certificado comissão de ética



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Modelo experimental de tumor ortotópico de próstata humano xenotransplantado em camundongos imunossuprimidos farmacologicamente", registrada com o nº 946/2018, sob a responsabilidade de **Rondon Tosta Ramalho** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 4ª reunião ordinária do dia 17/05/2018.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1º/05/2018 a 31/12/2019
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Mus musculus</i> / Hairless
Nº de animais	40
Peso/Idade	30 - 35g / 6 – 8 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central/INBIO/UFMS

Joice Stein
Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 18 de maio de 2018.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.propp@ufms.br
fone (67) 3345-7925

ANEXO 2

Qualis da revista

Qualis Periódicos

*** Evento de Classificação:**
CLASSIFICAÇÕES DE PERIÓDICOS QUADRIÊNIO 2013-2016 ▼

Área de Avaliação:
☒ INTERDISCIPLINAR ▼ +

ISSN:
☒ 2411-2933

Título:
☐

Classificação:
☐ -- SELECIONE -- ▼

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
2411-2933	INTERNATIONAL JOURNAL FOR INNOVATION EDUCATION AND RESEARCH	INTERDISCIPLINAR	A2