

**PEDRO HENRIQUE DIAS MOURA PRAZERES**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PERICITOS DE LESÃO NEOPLÁSICA  
INTRAEPITELIAL PROSTÁTICA DE CAMUNDONGOS HI-MYC**

**BELO HORIZONTE - MG**

**FEVEREIRO DE 2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PERICITOS DE LESÃO NEOPLÁSICA  
INTRAEPITELIAL PROSTÁTICA DE CAMUNDONGOS HI-MYC**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Patologia – Área de concentração em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Alexander Birbrair

Co-orientadoras: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helen Lima Del Puerto e Dr.<sup>a</sup> Leda Maria de Castro Coimbra Campos

**BELO HORIZONTE – MG**

**FEVEREIRO DE 2020**

043 Prazeres, Pedro Henrique Dias Moura.

Avaliação da expressão gênica de pericitos de lesão neoplásica intraepitelial prostática de camundongos Hi-Myc [manuscrito] / Pedro Henrique Dias Moura Prazeres. - 2020.

71 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Alexander Birbrair. Co-orientadoras: Prof.<sup>a</sup> Dr.a Helen Lima Del Puerto e Dr.a Leda Maria de Castro Coimbra Campos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.

CDU: 616

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**“Avaliação da Expressão Gênica de Pericitos de Lesão  
Neoplásica Intraepitelial Prostática de Camundongos Hi-Myc”**

**PEDRO HENRIQUE DIAS MOURA PRAZERES**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de  
Pós-Graduação em Patologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em  
PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

*Ivana Márcia Alves Diniz*  
**Profa. Ivana Márcia Alves Diniz**  
Faculdade de Odontologia/UFMG

*Fabiana Alves*  
**Profa. Fabiana Alves**  
Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix

*Helen Lima Del Puerto*  
**Profa. Helen Lima Del Puerto**  
ICB/UFMG - CO-ORIENTADORA

*Leda Maria de Castro Coimbra Campos*  
**Profa. Leda Maria de Castro Coimbra Campos**  
ICB/UFMG - CO-ORIENTADORA

*Alexander Birbrair*  
**Prof. Alexander Birbrair**  
ICB/UFMG - ORIENTADOR

Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2020.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Hlvio e Marisa, e  minha irmã, Júlia, que sempre me apoiaram nessa trajetória; pela força, carinho, dedicação e cuidado que me demonstraram por toda a vida e com quem aprendi muito mais do que qualquer bancada possa ensinar. Se hoje estou aqui é porque eles me deram forças e todas as condições necessárias para o sucesso.

 Mariana, minha tão paciente namorada, pelo amor, carinho, compreensão, discussões e apoio em todos os momentos dessa caminhada que traçamos juntos em nossas vidas. Sabemos que a barra é pesada, mas aliviamos mutuamente a carga com muito trabalho.

Ao meu orientador, Alexander Birbrair, pelos ensinamentos, discussões, confiança e oportunidades que foram desenvolvidas nesse período.

 minha co-orientadora, Helen Lima, pelos incontáveis ensinamentos sobre ciência e sobre a vida e por ser um exemplo de professora e cientista desde tanto tempo que nos conhecemos.

 minha co-orientadora, Leda Campos, por ter facilitado a caminhada e ajudado tanto na discussão quanto na elaboração de vários pontos do trabalho.

s participantes da banca, Ivana e Fabiana, que tenho certeza que vão contribuir para publicarmos um bom trabalho.

À Dra. Lis Antonelli que foi essencial na padronização e execução do isolamento de células e à Plataforma de Citometria de Fluxo da FIOCRUZ-Minas da Rede de Plataformas Tecnológicas da FIOCRUZ pela realização dos sortings de alta velocidade no equipamento FACSaria II, executado por Ana Beatriz Ribeiro de Queiroz (Tiza).

Aos amigos do laboratório, Carol Leonel e Walison, que tanto suportaram durante tanto tempo de mestrado, foram essenciais nas discussões e execução dos experimentos, além de serem sempre um alívio em momentos difíceis pelos quais passamos juntos.

Aos amigos do Birbrair Lab, que contribuíram na discussão do trabalho e com quem passei tanto tempo no meu dia-a-dia durante a iniciação científica e o mestrado.

Aos amigos do LCC, por terem me aguentado por tanto tempo pedindo café e conversando para passar o tempo ou o estresse diário, além de terem contribuído com as discussões e colaborado de outras formas com o trabalho.

Aos amigos do CTMM, neurocientistas sensacionais que tive o prazer de conviver e que me ensinaram coisas que nunca imaginaria antes. A parceria e a contribuição de vocês foram essenciais para o trabalho e para meu desenvolvimento como cientista.

Aos amigos do LIB, por terem me adotado e me dado tanto café por tanto tempo. A contribuição de vocês foi muito além da ciência.

Aos colaboradores da Qiagen que participaram do processo de aprovação do projeto, compra e envio dos reagentes e equipamentos sem os quais esse trabalho com certeza teria tomado um rumo diferente.

À equipe do Laboratório de Técnicas do Departamento de Patologia, que desde sempre foram uma ajuda fora do comum.

A todos os professores do Departamento de Patologia Geral, principalmente Ricardo Gonçalves, Ênio Ferreira, Geovanni Cassali e Paula Peixoto, por todos os ensinamentos e contribuições para minha formação pessoal e científica.

À todos os que passaram qualquer quantidade de tempo no Birbrair Lab, por menor que tenha sido nosso contato alguma marca foi deixada mutualmente.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

**A todos, o meu muito obrigado!**

“‘They have only differed on some point of science,’ he thought; and being a man of no scientific passions, he even added: ‘It is nothing worse than that!’”

**Robert Louis Stevenson**

**Esse trabalho foi realizado Laboratório de Microambiente Tecidual - Birbrair Lab e no Laboratório de Comportamento Celular do Departamento de Patologia Geral – ICB / UFMG em parceria com o Laboratório de Biologia e Imunologia Parasitária – Instituto René Rachou, com apoio financeiro do CNPq e da Qiagen.**



## RESUMO

O câncer de próstata é uma neoplasia com alta prevalência e mortalidade tanto na população brasileira quanto na população mundial. A progressão neoplásica na próstata se inicia, em geral, a partir da expressão de oncogenes ou da supressão de genes supressores de tumor em células epiteliais. A proliferação dessas células leva a formação de lesões neoplásicas intraepiteliais prostáticas (PIN) que não são capazes de invadir tecidos vizinhos, mas induzem uma resposta das células estromais, acarretando uma alteração do microambiente da próstata. As PIN podem evoluir de grau e darem origem a adenocarcinomas, estágio invasivo da neoplasia. Como forma de estudar o microambiente tumoral e as alterações que ocorrem durante a formação das lesões são utilizados diferentes modelos de camundongos transgênicos. Esses modelos permitem estudar a evolução das lesões e como os componentes celulares presentes no microambiente podem ser alterados no processo. Uma população celular importante no microambiente tumoral são os pericitos, que se localizam ao redor de vasos sanguíneos, controlam a permeabilidade e tensão vascular e apresentam alta plasticidade. Por responderem a estímulos em diferentes tipos de lesão, pericitos podem ser alterados pelo microambiente de forma a favorecer a regeneração. Assim, focamos em estudar a expressão de genes relacionados à progressão tumoral em diferentes graus de PIN como forma de estudar o papel dos pericitos em estágios pré-malignos. Neste trabalho foram utilizados camundongos transgênicos que desenvolvem PIN pela expressão de c-Myc especificamente nas células epiteliais da próstata e possuem pericitos com fluorescência endógena. As lesões prostáticas dos animais foram caracterizadas aos 6 e aos 12 meses de idade como de baixo e alto grau respectivamente. Foram identificados pericitos nas lesões desses animais, e foi verificado que tanto o número quanto a área de cobertura dessas células aumentaram com a progressão da lesão. Para estudar a expressão gênica de pericitos foi padronizado um protocolo para isolamento dessas células por citometria de fluxo com base em sua fluorescência endógena. Foi avaliado um painel de 84 genes classicamente envolvidos no câncer de próstata em pericitos isolados das lesões de diferentes graus, bem como de próstatas saudáveis. Os dados de expressão gênica demonstram que alguns genes supressores de tumor aumentaram sua expressão em lesões de alto grau (Gpx3, Gstp1, Rb1, Sfn e Sfrp1), enquanto outro diminuiu (Ints6). Outros genes associados ao funcionamento da próstata, regulação do ciclo celular e apoptose estavam aumentados nos dois graus da lesão (AR, Cav2, Pten e Trp53). De forma contrastante, alguns genes supressores de tumor estavam diminuídos nos dois graus da lesão (Dab2ip e Dkk3), o que levanta a hipótese de que fatores epigenéticos podem influenciar o papel desses genes em pericitos durante a progressão da lesão prostática. A relação desses genes com a sobrevida de pacientes com adenocarcinoma de próstata foi avaliada em uma base de dados disponibilizada publicamente. Foi verificado que a alta expressão dos genes Gpx3 e Timp3 associa-se com a redução na sobrevida dos pacientes em relação a pacientes com baixa expressão de tais genes, o que valida a importância de se avaliar a expressão gênica como ferramenta clínica no manejo de neoplasias.

**Palavras-chave:** Câncer de próstata; Pericitos; Expressão gênica; Modelos animais transgênicos

## ABSTRACT

Prostate cancer displays high prevalence and mortality in both the Brazilian population and around the world. Prostate cancer progression initiates, in general, from the expression of oncogenes or suppression of tumor suppressor genes in epithelial cells. The proliferation of these cells marks the onset of prostatic intraepithelial neoplasias (PIN), which are not able to invade the surrounding tissues, but leads to a response of stromal cells that finally alter the prostate microenvironment. PINs can evolve in grade and originate invasive adenocarcinomas. An alternative to studying the tumor microenvironment and the alterations involved in the formation of lesions is the use transgenic mouse models. These models allow the evaluation of different stages of the lesions and how the cellular components of the microenvironment are altered during the process. An important cell population present within the tumor microenvironment is pericytes, which are located around the blood vessels, control vascular permeability and tension and are highly plastic. Pericytes respond to stimuli in different types of lesion, and can be altered by the microenvironment favoring the regeneration of the tissue. Thus, we focused on studying the expression of genes involved in tumor progression in different stages of PIN as a way to explore the role of pericytes in pre-malignant lesions. In this work we used mice that develop PIN by the expression of c-Myc specifically in prostate epithelial cells and express endogenous fluorescence in pericytes. Prostatic lesions in the mice were characterized at 6 and 12 months of age as high and low grade respectively. Pericytes were identified within these lesions, and their number and coverage area increased as the lesion progressed. To study gene expression of pericytes a protocol for isolating these cells based on their fluorescence was established. We analyzed a panel of 84 genes commonly involved in prostate cancer in pericytes isolated from different stages of PIN, as well as from healthy prostates. Gene expression data show that some tumor suppressor genes are upregulated in high grade lesions (Gpx3, Gstp1, Rb1, Sfn e Sfrp1), whereas another is downregulated (Ints6). Other genes associated with normal prostatic functions, cell cycle regulation and apoptosis were upregulated in both stages (AR, Cav2, Pten e Trp53). Contrastingly, other tumor suppressor genes were downregulated in both stages of the lesion (Dab2ip e Dkk3), which raises the hypothesis that epigenetic factors might influence the role of these genes in pericytes of pre-malignant prostatic lesions. The correlation of these genes with the survival of patients with prostate cancer was assessed in a public available database. Survival data suggest that high expression of Gpx3 and Timp3 associates with a reduction in patient survival, when compared to patients with low expression, which validates the importance of evaluating gene expression as a tool in the clinical management of neoplasias.

**Keywords:** Prostate cancer; Pericytes; Gene expression.; Transgenic mouse models

## LISTA DE FIGURAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1 – Comparação da anatomia das próstatas murina e humana.....</b>                      | <b>16</b> |
| <b>Figura 2 – Potencial de diferenciação de subtipos de pericitos.....</b>                       | <b>25</b> |
| <b>Figura 3 – Genotipagem e fenotipagem dos animais.....</b>                                     | <b>34</b> |
| <b>Figura 4 – Histologia da próstata de animais Hi-Myc<sup>-</sup> e Hi-Myc<sup>+</sup>.....</b> | <b>36</b> |
| <b>Figura 5 – Pericitos em lesões prostáticas de baixo e alto grau.....</b>                      | <b>38</b> |
| <b>Figura 6 – Padronização do isolamento de pericitos por citometria de fluxo.....</b>           | <b>41</b> |
| <b>Figura 7 – Expressão de genes em lesões prostáticas de baixo e alto grau.....</b>             | <b>43</b> |
| <b>Figura 8 – Sobrevida de pacientes com câncer de próstata acompanhada por 5 anos.....</b>      | <b>45</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR: *Androgen receptor*

B2M: *Beta-2 microglobulin*

CaP: Câncer de próstata

CAP: Centro de Aquisição e Processamento de Imagens

Cav2: *Caveolin 2*

CK5 e CK18: Citoqueratina 5 e Citoqueratina 18

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

C<sub>t</sub>: *Cycle threshold*

Dab2ip: *Disabled homolog 2 (Drosophila) interacting protein*

DAPI: 4',6'-diamino-2-fenil-indol

Dkk3: *Dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)*

FACS: *Fluorescence activated cell sorting*

GEMM: *Genetically engineered mouse models*

Gpx3: *Glutathione peroxidase 3*

Gstp1: *Glutathione S-transferase, pi 1*

HBP: Hiperplasia benigna prostática

HGPIN: *High-grade prostatic intraepithelial neoplasia* (neoplasia intraepitelial prostática de alto grau)

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

INCA: Instituto Nacional do Câncer

Ints6: *Integrator complex subunit 6*

LGPIN: *Low-grade prostatic intraepithelial neoplasia* (neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau)

MGDC: *Mouse genomic DNA contamination* (contaminação por DNA genômico de camundongo)

Nfkb1: *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105*

NG2: *Neuroglia 2*

OCT: *Optimum cutting temperature*

PAP: Fosfatase alcalina

PDGFR $\beta$ : Platelet derived growth factor beta (fator de crescimento derivado de plaquetas beta)

PIN: *Prostatic intraepithelial neoplasia* (neoplasia intraepitelial prostática)

PPC: *Positive PCR control* (controle positivo de PCR)

PSA: Antígeno específico prostático

Pten: *Phosphatase and tensin homolog*

Rb1: *Retinoblastoma 1*

RTC: *Reverse transcription control* (controle da transcrição reversa)

Sfn: *Stratifin*

Sfrp1: *Secreted frizzled-related protein 1*

Socs3: *Suppressor of cytokine signaling 3*

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

TEM: Transição epitélio mesênquima

Timp2 e Timp3: *Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 e Tissue inhibitor of metalloproteinase 3*

TRAMP: *Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate*

Trp53: *Transformation related protein 53*

UCSC: *University of California Santa Cruz*

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF: *Vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento vascular endotelial)

$\alpha$ -SMA: *Alfa smooth muscle actin* (alfa actina de músculo liso)

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. Introdução .....   | 14 |
| 2. Revisão de literatura.....   | 16 |
| 2.1 Próstata .....  | 16 |
| 2.2 Câncer de próstata .....  | 19 |
| 2.3 Modelos para estudo do câncer de próstata .....                       | 20 |
| 2.4 c-Myc .....   | 23 |
| 2.5 Pericitos.....  | 24 |
| 2.6 Pericitos em neoplasias.....  | 27 |
| 3. Justificativa .....  | 28 |
| 4. Hipótese.....  | 28 |
| 5. Objetivos .....  | 29 |
| 5.1 Objetivo geral .....  | 29 |
| 5.2 Objetivos específicos.....  | 29 |
| 6. Materiais e métodos .....  | 29 |
| 6.1. Animais.....   | 29 |
| 6.2 Análises histológicas.....  | 30 |
| 6.3 Microscopia confocal .....  | 30 |
| 6.3.1 Aquisição de imagens e análise.....                                 | 31 |
| 6.4 Isolamento de pericitos por FACS .....                                | 31 |
| 6.5 Extração de RNA e RT-PCR .....  | 32 |
| 6.6 qPCR .....  | 32 |
| 6.7 Curvas de sobrevida .....   | 33 |
| 6.8 Análise estatística.....  | 33 |
| 7. Resultados .....   | 33 |
| 7.1 Separação de grupos em função do genótipo e fenótipo.....             | 33 |
| 7.2 Desenvolvimento de lesões intraepiteliais em camundongos Hi-Myc ..... | 36 |
| 7.3 Quantificação de pericitos em lesões prostáticas.....                 | 38 |
| 7.4 Padronização do isolamento de pericitos por FACS.....                 | 41 |
| 7.5 Expressão gênica de pericitos .....                                   | 43 |
| 7.6 Relação dos genes com sobrevida .....                                 | 45 |

|   |    |
|---|----|
| 8. Discussão.....   | 47 |
| 9. Conclusões .....   | 49 |
| 10. Considerações finais e perspectivas .....                                   | 49 |
| 11. Referências .....   | 51 |
| 12. Anexos.....   | 64 |
| Anexo I – Aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG.....         | 64 |
| Anexo II – Genes analisados por qPCR (Qiagen – PAMM-135ZR Cat. no. 330231)..... | 65 |
| Anexo III – Genes e vias analisadas.....  | 67 |
| Anexo IV – Curvas de sobrevida .....  | 69 |

## 1. Introdução

O câncer de próstata, no Brasil, é a neoplasia de maior incidência na população masculina, excluindo-se os tumores de pele não-melanoma. No mundo, essa neoplasia configura como a segunda mais incidente, perdendo apenas para o câncer de pulmão (SAÚDE, 2017; STEWART; WILD, 2014). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) em 2017 estimou mais de 120 mil novos casos dessa neoplasia para o biênio 2018-2019 (SAÚDE, 2017). Associada a essa alta incidência, o câncer de próstata figura como a quinta maior causa de morte em homens, representando 6,6% do total de mortes relacionadas a câncer na população masculina, como demonstrado no projeto Globocan da Organização Mundial de Saúde em 2015 (FERLAY; SOERJOMATARAM; DIKSHIT; ESER *et al.*, 2015).

O câncer de próstata em humanos deriva de lesões precursoras caracterizadas pela proliferação focal de células atípicas denominada neoplasia intraepitelial prostática (PIN – prostatic intraepitelial neoplasia) (REYES; SWANSON; CARBONE; HUMPHREY, 1997). Apesar de não ser fenotipicamente maligna, a PIN pode evoluir para um estágio denominado de alto grau (HGPIN – high-grade prostatic intraepitelial neoplasia) (REYES; SWANSON; CARBONE; HUMPHREY, 1997). Esse tipo de lesão é considerado o estágio mais precoce da carcinogênese, pois é fenotipicamente mais semelhante ao carcinoma do que a PIN, sem, no entanto, causar invasão da membrana basal (BOSTWICK; QIAN, 2004). Peter Humphrey, em 2012, revisou as diferentes variantes de denominação do câncer de próstata (HUMPHREY, 2012). De maneira geral, 99% dos casos de câncer de próstata humanos são adenocarcinomas que derivam de HGPIN após invasão do estroma pelas células epiteliais (GRABOWSKA; DEGRAFF; YU; JIN *et al.*, 2014). O 1% restante dos casos é de carcinomas de células neuroendócrinas, carcinomas de células pequenas e carcinomas sarcomatoides (GRABOWSKA; DEGRAFF; YU; JIN *et al.*, 2014; HUMPHREY, 2012).

Modelos de animais geneticamente modificados (GEMM – genetically engineered mouse models) são amplamente utilizados no estudo de neoplasias. Em sua maioria, esses animais desenvolvem adenocarcinomas escamosos ou com diferenciação mucosa, características incomuns em neoplasias humanas (GRABOWSKA; DEGRAFF; YU; JIN *et al.*, 2014). Esses adenocarcinomas derivam de lesões pré-malignas que são graduadas de I a IV como definido por Park e colaboradores (PARK; WALLS; GALVEZ; KIM *et al.*, 2002). Além disso, os tumores



desses animais, sejam invasivos ou não, levam a uma reatividade das células estromais (ITTMANN; HUANG; RADAELLI; MARTIN *et al.*, 2013). A escolha do modelo animal adequado depende de qual característica do tumor se deseja estudar. Adicionalmente, a diversidade de modelos permite avaliar como a progressão do tumor de próstata afeta diferentes componentes do microambiente tumoral, como vasos sanguíneos, nervos e células tronco (MAGNON; HALL; LIN; XUE *et al.*, 2013; OZAWA; YAO; CHANTHERY; TRONCOSO *et al.*, 2005; ZAHALKA; ARNAL-ESTAPÉ; MARYANOVICH; NAKAHARA *et al.*, 2017)

Durante muito tempo o estudo de neoplasias permaneceu restrito ao estudo do comportamento das células neoplásicas dentro do microambiente tumoral (HANAHAN; COUSSENS, 2012). Porém, o microambiente no qual esses tumores se instalam torna-se cada vez mais complexo com o passar do tempo, e a sinalização entre células neoplásicas e células estromais torna-se essencial para a progressão do tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Uma das características marcantes da progressão tumoral, que reflete da alteração do microambiente, é a indução de angiogênese principalmente como forma de garantir o aporte nutricional e a retirada de metabolitos do microambiente tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A angiogênese depende da ativação de células endoteliais de vasos quiescentes, normalmente vizinhos ao tumor, que respondem a fatores pró-angiogênicos como VEGF e emitem brotamentos (RIBATTI; CRIVELLATO, 2012). Para que esses vasos sejam funcionais é necessário que sejam estabilizados por uma matriz perivascular formada principalmente por pericitos e células de músculo liso entremeados na membrana basal das células endoteliais (VON TELL; ARMULIK; BETSHOLTZ, 2006).

Os pericitos podem ser encontrados, em maior ou em menor quantidade, em praticamente todos os órgãos (BIRBRAIR; ZHANG; WANG; MESSI *et al.*, 2015). Até meados do século XX sua caracterização era baseada principalmente em aspectos morfológicos e em sua localização (ZIMMERMANN, 1923) até que, com o advento de técnicas de biologia molecular e imunohistoquímica, foram definidos marcadores de especificidades variadas que são expressos em determinadas condições (ARMULIK; GENOVÉ; BETSHOLTZ, 2011). Trabalhos recentes demonstraram que a expressão de NG2, PDGFR $\beta$ , Nestina e  $\alpha$ -SMA são bons indicativos para identificação de pericitos, sendo utilizados tanto como alvos para imunofluorescência quanto em modelos animais transgênicos (ARMULIK; GENOVÉ; BETSHOLTZ, 2011; CORSELLI;

CHEN; CRISAN; LAZZARI *et al.*, 2010). Os pericitos já foram bem caracterizados como células vasculares envolvidas na angiogênese fisiológica e tumoral (BIRBRAIR, ALEXANDER; ZHANG, TAN; WANG, ZHONG-MIN; MESSI, MARIA LAURA *et al.*, 2014; VON TELL; ARMULIK; BETSHOLTZ, 2006), na contratilidade (BERGERS; SONG, 2005) e no controle da permeabilidade vascular (LEMOS; MARSH; HUANG; CAMPANHOLLE *et al.*, 2016). Atualmente, o estudo dessa célula também abrange seu potencial de célula tronco (BIRBRAIR, ALEXANDER; ZHANG, TAN; WANG, ZHONG-MIN; MESSI, MARIA L. *et al.*, 2014), seu potencial de resposta a diferentes lesões (BIRBRAIR; ZHANG; FILES; MANNAVA *et al.*, 2014), sua capacidade de sinalização em determinados nichos (KHAN; MENDELSON; KUNISAKI; BIRBRAIR *et al.*, 2016) e sua possível aplicação como ferramenta de terapia celular (BIRBRAIR, ALEXANDER; ZHANG, TAN; WANG, ZHONG-MIN; MESSI, MARÍA LAURA *et al.*, 2013).

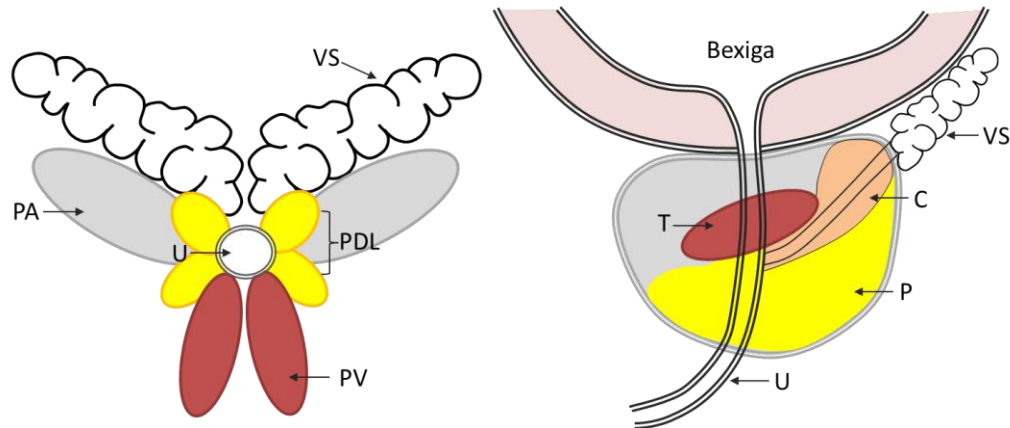
Sendo a angiogênese e a modulação do microambiente características marcantes da progressão de neoplasias muito incidentes como o câncer de próstata, o estudo dos pericitos nessa neoplasia torna-se interessante como forma de compreender melhor esse microambiente, bem como identificar formas de manipular essa célula para fins terapêuticos.

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1 Próstata**

A próstata é uma glândula anexa do sistema reprodutor masculino. Nos humanos ela se localiza abaixo da bexiga circundando a porção proximal da uretra (uretra prostática) e os ductos ejaculatórios (RISBRIDGER; TAYLOR, 2006). Vários trabalhos de John McNeal e colaboradores da segunda metade do século XX descreveram a anatomia da próstata dividindo o órgão em zonas. Essas zonas foram denominadas periférica, central e de transição e são circundadas por um estroma fibromuscular. Os achados de McNeal demonstram que as diferentes zonas da próstata apresentam quantidades de epitélio glandular variável (**Figura 1**). A zona periférica compreende a maior parte do tecido glandular, seguida pela zona central e finalmente a zona de transição, que representa cerca de 5% da massa da próstata (MCNEAL, J., 1980; MCNEAL, 1968; MCNEAL, J. E., 1980; MCNEAL, 1981; 1988). Além disso, as zonas apresentam susceptibilidades diferentes a certos distúrbios do crescimento. A zona periférica é a

mais susceptível ao desenvolvimento do câncer de próstata, enquanto a zona de transição é mais susceptível a hiperplasia benigna (MCNEAL; REDWINE; FREIHA; STAMEY, 1988). A zona central não é tão susceptível a distúrbios do crescimento, sendo mais acometida por processos inflamatórios (prostatite) (MCNEAL; REDWINE; FREIHA; STAMEY, 1988).



**Figura 1 – Comparação da anatomia das próstatas murina e humana.** Desenho esquemático representando a divisão anatômica das próstatas murina (esquerda) e humana (direita). Cores semelhantes representam lobos e zonas semelhantes em quantidade de tecido epitelial glandular. Vesícula seminal (VS); Próstata anterior (PA); Próstata dorsolateral (PDL); Próstata ventral (PV); Uretra (U); Zona central (C); Zona de transição (T); Zona periférica (P).

Fisiologicamente a próstata responde a andrógenos tanto para seu desenvolvimento quanto para a produção de secreções (WILSON, 1996). A secreção prostática compõe cerca de 30% do volume do ejaculado e, juntamente com a secreção de outras glândulas anexas, como a glândula bulbouretral, mantêm níveis de eletrólitos e proteínas adequados, a fim de garantir a viabilidade e a qualidade espermática, favorecendo a fertilização (MORITA; CHANG, 1971; NIESCHLAG; BEHRE; NIESCHLAG; VAN AHLEN, 2011).

Histologicamente, o epitélio da próstata humana é pseudoestratificado e composto por três tipos celulares: células luminiais secretórias, células basais e células neuroendócrinas, essa última sendo pouco encontrada a não ser em alguns tipos de neoplasias (AUMÜLLER; LEONHARDT; RENNEBERG; VON RAHDEN *et al.*, 2001; DI SANT'AGNESE; COCKETT, 1996; MCNEAL, 1968). As células luminiais respondem a andrógenos e são as principais responsáveis pela produção das secreções da próstata sendo que seus produtos mais importantes são o antígeno

específico prostático (PSA) e a fosfatase alcalina (PAP), proteínas encontradas no fluído seminal e no sangue e utilizadas como biomarcadores no diagnóstico do câncer de próstata (PRENSNER; RUBIN; WEI; CHINNAIYAN, 2012; WRIGHT; THOMAS; DOUGLAS; LAZIER *et al.*, 1996). As células basais não possuem potencial secretório, mas, por não responderem a andrógenos e serem capazes de se diferenciar em células luminais, representam uma população de células tronco residentes importantes durante a regeneração do epitélio após privação de andrógenos (castração) (BONKHOFF; REMBERGER, 1993; BONKHOFF; REMBERGER, 1996; DE MARZO; MEEKER; EPSTEIN; COFFEY, 1998; EL-ALFY; PELLETIER; HERMO; LABRIE, 2000).

Apesar de representarem a parte funcional da próstata, estudos do fim do século XX já demonstraram que as células luminais e basais não são capazes de se manter funcionais sem a interação com o estroma (CUNHA; CHUNG; SHANNON; REESE, 1980; FRANKS; RIDDLE; CARBONELL; GEY, 1970). Foi demonstrado que fatores de crescimento, citocinas e hormônios provenientes do estroma são importantes na maturação da próstata, na manutenção de suas funções normais e na prevenção do surgimento e progressão de neoplasias (FARNSWORTH, 1999; MAGNON; HALL; LIN; XUE *et al.*, 2013; ZAHALKA; ARNAL-ESTAPÉ; MARYANOVICH; NAKAHARA *et al.*, 2017). Vale ressaltar que o estroma da próstata é composto, além da matriz extracelular, por diversos tipos celulares (células imunes, células perivasculares, vasos sanguíneos, nervos e células associadas a eles), cada um com sua função, que em conjunto permitem o funcionamento normal do órgão (FARNSWORTH, 1999; TUXHORN; AYALA; ROWLEY, 2001).

Dentre as células estromais que respondem a injúrias, se destacam os fibroblastos e miofibroblastos que exercem papéis importantes durante o reparo como a deposição de matriz extracelular (HINZ; GABBIANI, 2010). No entanto, propõe-se que células associadas a vasos, como pericitos, células musculares lisas e células tronco mesenquimais; bem como células associadas a nervos periféricos, como células de Schwann também participem do processo de reparo em diferentes órgãos. Dessa forma, estudos sugerem que tais células também possam desempenhar algum papel na progressão de neoplasias (BIRBRAIR; ZHANG; FILES; MANNAVA *et al.*, 2014; BIRBRAIR, ALEXANDER; ZHANG, TAN; WANG, ZHONG-MIN; MESSI, MARIA L. *et al.*, 2014; SILVA; LEONEL; PRAZERES; SENA *et al.*, 2018).

## 2.2 Câncer de próstata

De acordo com estimativas do INCA (2017), foram estimados para o biênio 2018-2019 mais de 120 mil novos casos de câncer de próstata no Brasil (SAÚDE, 2017). O INCA também cita que, no mesmo período, o câncer de próstata será o mais frequente em homens, figurando como o de maior incidência (31,7%) excluindo o câncer de pele não melanoma (SAÚDE, 2017). Foi publicado por Ferlay e colaboradores, em 2015, uma estimativa mundial de incidência e mortalidade dos 27 tipos de câncer mais comuns com dados compilados em 2012 (FERLAY; SOERJOMATARAM; DIKSHIT; ESER *et al.*, 2015). Desde então o cenário do câncer de próstata já era alarmante, com mais de um milhão de casos e mais de 300 mil mortes relatadas no mundo (FERLAY; SOERJOMATARAM; DIKSHIT; ESER *et al.*, 2015).

Os distúrbios do crescimento e diferenciação celular mais comumente encontrados na próstata são a hiperplasia benigna prostática (HBP) e o câncer de próstata (CaP), que deriva de lesões intraepiteliais denominadas PIN e HGPIN (GRABOWSKA; DEGRAFF; YU; JIN *et al.*, 2014; MCNEAL, 1968; MCNEAL; REDWINE; FREIHA; STAMEY, 1988). Por envolverem principalmente células que respondem a andrógenos, essas alterações se correlacionam fortemente com níveis aumentados de testosterona e dihidrotestosterona (PIENTA; ESPER, 1993; THACKARE; NICHOLSON; WHITTINGTON, 2006).

A PIN é caracterizada pela proliferação anormal de células no interior dos ductos ou ácinos da próstata sem invasão do estroma (BOSTWICK; BRAWER, 1987). O termo PIN atualmente é bastante utilizado, substituindo os termos displasia, transformação maligna e carcinoma *in situ* (BOSTWICK; MONTIRONI; SESTERHENN, 2000). Em geral, lesões denominadas PIN podem ser de baixo grau (LGPIN) ou de alto grau (HGPIN), sendo que a HGPIN deve ser descrita como achado patológico de biópsias ou ressecções de próstata. A HGPIN é considerada o estágio mais precoce da carcinogênese da próstata, possui um alto valor preditivo no diagnóstico de adenocarcinomas e único método de detecção é a biópsia, uma vez que essa lesão não acarreta aumento dos níveis séricos de PSA (BOSTWICK; MONTIRONI; SESTERHENN, 2000; BOSTWICK; QIAN, 2004).

O CaP afeta principalmente a zona periférica, que contém o maior percentual de tecido epitelial glandular (MCNEAL, 1968). Estudos com autópsias humanas identificaram características

histológicas de câncer de próstata em 15 a 30% de homens com mais de 50 anos, sendo que esse número aumentava para 60 a 70% em homens com 80 anos ou mais (FRANKS, 1956; WYNDER; MABUCHI; WHITMORE, 1971). O CaP deriva principalmente das células luminais, que são as mais responsivas a andrógenos (CUNHA; CHUNG; SHANNON; REESE, 1980). No entanto, alguns autores sugerem que essas células são apenas parte do problema, uma vez que, ao acumularem mutações e perderem o controle da proliferação, elas alteram o microambiente tecidual em benefício próprio (CUNHA; HAYWARD; WANG, 2002; CUNHA; MATRISIAN, 2002). O processo de carcinogênese leva a um desbalanço nas interações entre o tecido epitelial glandular e os tecidos vizinhos, e já foi sugerido que o estroma reage às transformações malignas podendo contribuir para a progressão tumoral e para a formação de metástases (HAYWARD; ROSEN; CUNHA, 1997; LIN; LEE; YU; CHENG *et al.*, 2017).

Uma vasta rede de capilares sanguíneos está presente no estroma da próstata e é responsável pela manutenção das funções normais do órgão, garantindo acesso a nutrientes, oxigênio e hormônios (FARNSWORTH, 1999). Apesar da ampla distribuição de vasos pelo estroma, a angiogênese é bastante controlada na próstata e é inibida na ausência de andrógenos, assim como a proliferação de células luminais (CAMPBELL, 1997; FARNSWORTH, 1999). A rede vascular é de extrema importância para a progressão de tumores, uma vez que tumores sólidos dependem da formação de novos vasos para seu crescimento (FOLKMAN; WATSON; INGBER; HANAHAN, 1989). A transição de um tecido hiperplásico para uma neoplasia altamente vascularizada depende de uma maior quantidade de fatores pró-angiogênicos (por exemplo, VEGF) em relação a fatores anti-angiogênicos denominada “switch angiogênico” (BERGERS; BENJAMIN, 2003). No câncer de próstata esse processo pode ser controlado por componentes celulares e proteicos presentes no estroma que, como demonstrado em modelos de tumores experimentais, influenciam na malignidade do tumor (ZAHALKA; ARNAL-ESTAPE; MARYANOVICH; NAKAHARA *et al.*, 2017). Avaliar a interdependência entre componentes celulares do estroma e a progressão do tumor de próstata viabiliza o estudo da neoplasia por uma perspectiva diferente, e abre portas para novos conhecimentos e possíveis abordagens terapêuticas.

### **2.3 Modelos para estudo do câncer de próstata**

O estudo do microambiente tumoral da próstata era baseado principalmente na análise de biópsias humanas (SCHER; HALABI; TANNOCK; MORRIS *et al.*, 2008; SUN; SPRENGER;

VESSELLA; HAUGK *et al.*, 2010). Isso levou a um maior entendimento sobre esse tipo de neoplasia, como a determinação de características genéticas e o estabelecimento de abordagens terapêuticas (STEWART; WILD, 2017). Como forma de facilitar o estudo sobre o comportamento celular das neoplasias, foram estabelecidas linhagens celulares a partir tecidos neoplásicos (KAIGHN; NARAYAN; OHNUKI; LECHNER *et al.*, 1979; NAVONE; OLIVE; OZEN; DAVIS *et al.*, 1997). Essas linhagens celulares mantêm características fenotípicas e genotípicas que remetem ao tumor que as originou, sendo muito úteis para avaliar citotoxicidade de candidatos a fármacos e estudar diferentes vias bioquímicas (JENKINS; QIAN; LIEBER; BOSTWICK, 1997; KLIONSKY; ABDELMOHSEN; ABE; ABEDIN *et al.*, 2016). Apesar de serem ferramentas muito úteis na pesquisa, linhagens celulares estão sujeitas a diversos problemas que vão desde instabilidade genômica a limitada representatividade inclusive dentro do mesmo tumor (MASTERS, 2000).

Outro ponto levantado por críticos do uso de linhagens celulares é que o ambiente *in vitro* é composto apenas por células neoplasias e, por isso, essas linhagens não representariam toda a complexidade do microambiente tumoral (WHITESIDE, 2008). Como forma alternativa para se estudar o microambiente tumoral, linhagens celulares e/ou tecidos neoplásicos passaram a ser transplantados para camundongos. Células ou tecidos humanos devem ser transplantados para camundongos imunossuprimidos (xenoenxertos) a fim de evitar rejeições que influenciem no crescimento do tumor (LIN; WYATT; XUE; WANG *et al.*, 2014; SZADVARI; KRIZANOVA; BABULA, 2016). Estudar tumores em xenoenxertos releva a participação do sistema imune no desenvolvimento da neoplasia, um componente importante do microambiente tumoral que vem sendo amplamente estudado e utilizado no desenvolvimento de novas terapias (KUMAR; PATEL; TCYGANOV; GABRILOVICH, 2016; MIAO; YANG; LEVORSE; YUAN *et al.*, 2019; O'DONNELL; TENG; SMYTH, 2019). Também podem ser utilizadas células neoplásicas derivadas de camundongos (aloenxerto), que são amplamente utilizadas por não gerarem rejeição, serem modelos para teste de novas terapias e permitirem o estudo do microambiente tumoral por completo, incluindo células imunes (AALINKEEL; NAIR; CHEN; MAHAJAN *et al.*, 2016; PARK; BUZZAI; RAUTELA; HOR *et al.*, 2019).

Modelos baseados em transplante de células ou tecidos para camundongos são úteis por serem rápidos e garantirem respostas confiáveis no desenvolvimento de terapias (AALINKEEL; NAIR;

CHEN; MAHAJAN *et al.*, 2016). Contudo, esses modelos falham em reproduzir o processo de carcinogênese que, em geral, se dá de forma bastante lenta e sofre influência de diversos fatores (LEITZMANN; ROHRMANN, 2012). Como forma de reproduzir o processo de carcinogênese na próstata, permitindo avaliar todos os estágios desde uma lesão pré-maligna até um carcinoma invasor, foram desenvolvidos modelos de indução química utilizando testosterona e compostos químicos mutagênicos (GONÇALVES; DE CAMPOS; ZANETONI; SCARANO *et al.*, 2013; PEIXOTO; SANTOS; BRANDT; DELELLA *et al.*, 2016). O maior problema desses modelos, apesar de recapitularem a progressão das lesões com alguma variabilidade, o acúmulo de mutações e o processo inflamatório envolvido na carcinogênese, é o risco associado à exposição aos compostos mutagênicos (HEUDORF; MERSCH-SUNDERMANN; ANGERER, 2007; REEVES; KANDYBA; HARRIS; DEL ROSARIO *et al.*, 2018).

Há mais de 15 anos animais geneticamente modificados começaram a ser desenvolvidos como modelos alternativos a fim de se estudar o processo de carcinogênese na próstata. Como levantado por Irshad e Abate-Shen, várias “gerações” desses animais já foram desenvolvidas, e ainda continuam sendo (ABATE-SHEN; SHEN, 2002; IRSHAD; ABATE-SHEN, 2013). A primeira geração desses animais possuía alterações genéticas em todas as células, como animais *knockout* total ou parcial para PTEN (gene supressor de tumor) (DI CRISTOFANO; DE ACETIS; KOFF; CORDON-CARDO *et al.*, 2001). Por se tratar de uma alteração genética não específica para determinada célula ou tecido, esse modelo recebe críticas, pois pode gerar diferentes tumores de origem epitelial (DI CRISTOFANO; DE ACETIS; KOFF; CORDON-CARDO *et al.*, 2001).

Como forma de contornar essa falta de especificidade, foi desenvolvido o primeiro modelo transgênico para câncer de próstata, denominado TRAMP, no qual a expressão de um antígeno viral (SV40) leva a inativação das proteínas supressoras de tumor Rb e p53 especificamente nas células epiteliais da próstata (ZHOU; FLESKEN-NIKITIN; CORNEY; WANG *et al.*, 2006). Esse modelo é criticado principalmente por desenvolver tumores de origem neuroendócrina, e por ser caracterizado por uma inativação não fisiológica das proteínas Rb e p53 (ZHOU; FLESKEN-NIKITIN; CORNEY; WANG *et al.*, 2006).

Novos modelos foram desenvolvidos seguindo a ideia da inativação de proteínas supressoras de tumor, sendo possível controlar de forma específica o momento e a célula alvo da mutação. Por



exemplo, o *knockout* condicional de PTEN das células luminais da próstata utilizando o sistema Cre-lox (RATNACARAM; TELETIN; JIANG; MENG *et al.*, 2008). Outra abordagem estudada no desenvolvimento desses modelos foi a expressão de proto-oncogenes restrita às células luminais da próstata. Dessa forma foi possível gerar modelos que, em sua maior parte, são menos agressivos que os anteriores e, diferentemente do TRAMP, tendem a não desenvolver tumores neuroendócrinos (IRSHAD; ABATE-SHEN, 2013).

Além de serem utilizados para recapitular fenótipos do adenocarcinoma prostático, modelos animais baseados na expressão de proto-oncogenes são aplicados no estudo de diferentes estágios do desenvolvimento tumoral (IRSHAD; ABATE-SHEN, 2013). Uma característica importante desses modelos é que permitem avaliar a presença e o comportamento de outras células presentes no microambiente da próstata durante a progressão da neoplasia (MAGNON; HALL; LIN; XUE *et al.*, 2013; MAUFFREY; TCHITCHEK; BARROCA; BEMELMANS *et al.*, 2019; ZAHALKA; ARNAL-ESTAPÉ; MARYANOVICH; NAKAHARA *et al.*, 2017). Com esses modelos também é possível avaliar como alterações comportamentais, por exemplo, depressão e ansiedade, podem afetar o comportamento da neoplasia, um fator que seria dificilmente controlado em humanos (CHENG; GAO; LI; CAO *et al.*, 2018; CHENG; TANG; LI; ZHAO *et al.*, 2019).

#### **2.4 c-Myc**

O gene c-Myc faz parte de uma família de genes primeiramente descrita em 1979, e amplamente estudada desde então em diferentes contextos (MEYER; PENN, 2008). Sua ativação está comumente relacionada ao desenvolvimento de tumores, e alguns trabalhos mostram que esse gene se encontra aumentado em mais da metade dos cânceres humanos (GABAY; LI; FELSHER, 2014; KALKAT; DE MELO; HICKMAN; LOURENCO *et al.*, 2017). O c-Myc atua como um fator de transcrição que controla diversos genes, e suas interações que se relacionam a tumorigênese foi descritas recentemente por Kalkat e colaboradores (KALKAT; RESETCA; LOURENCO; CHAN *et al.*, 2018).

Um papel importante do gene Myc no desenvolvimento de tumores é sua interação com elementos controladores do ciclo celular e apoptose, como ciclinas que regulam a transição de G1 para S e outros marcadores como p21 e p27 (BRETONES; DELGADO; LEÓN, 2015;

PRENDERGAST, 1999). Apesar do gene c-Myc não ser um alvo terapêutico para inibidores diretos, a ciclina CDK1 que é controlada por ele, foi identificada como alvo para terapia de linfoma e hepatoblastoma (GOGA; YANG; TWARD; MORGAN *et al.*, 2007). Isso indica que o papel do gene c-Myc na progressão tumoral permite que ele possa ser amplamente estudado como forma terapêutica ou como forma de se compreender o comportamento de alguns tumores.

Em cerca de 30% dos casos de câncer de próstata humanos, e também em neoplasias intraepiteliais, o gene c-Myc está aumentado (JENKINS; QIAN; LIEBER; BOSTWICK, 1997; QIAN; JENKINS; BOSTWICK, 1997). Para estudar o papel funcional do gene c-Myc foram desenvolvidos dois modelos de camundongos transgênicos que expressam o gene c-Myc exclusivamente nas células epiteliais da próstata (ELLWOOD-YEN; GRAEBER; WONGVIPAT; IRUELA-ARISPE *et al.*, 2003). Esse modelo apresenta vantagens em relação aos anteriores, pois é possível observar hiperplasia, neoplasias intraepiteliais de baixo e de alto grau e adenocarcinoma de próstata em animais imunocompetentes de forma endógena (sem a necessidade de agentes iniciadores e promotores da carcinogênese) (ELLWOOD-YEN; GRAEBER; WONGVIPAT; IRUELA-ARISPE *et al.*, 2003). Além disso, é possível associar esse modelo de desenvolvimento endógeno de tumor a outros modelos para estudar o comportamento de componentes do microambiente, e como esses afetam e/ou são afetados pela progressão tumoral (CHENG; GAO; LI; CAO *et al.*, 2018; CHENG; TANG; LI; ZHAO *et al.*, 2019; MAGNON; HALL; LIN; XUE *et al.*, 2013; ZAHALKA; ARNAL-ESTAPÉ; MARYANOVICH; NAKAHARA *et al.*, 2017).

## **2.5 Pericitos**

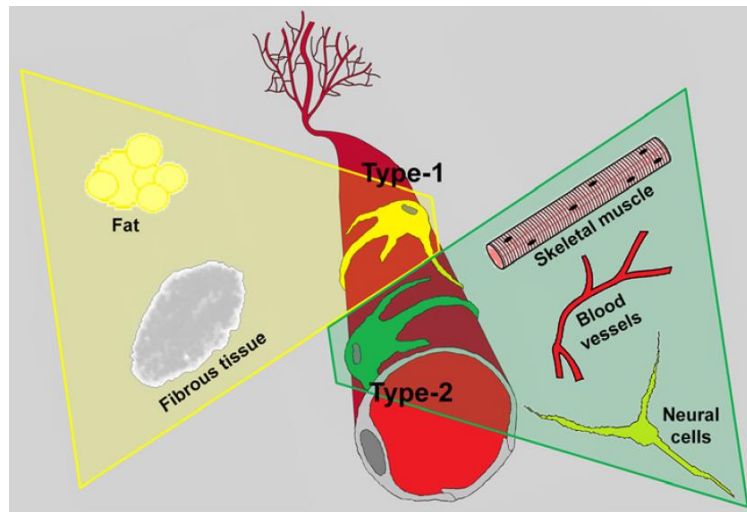
As primeiras observações sobre pericitos foram feitas no início do século XX por Rouget e Zimmerman (ROUGET, 1910; ZIMMERMANN, 1923). Inicialmente essa população celular recebeu o nome de “pericitos” por ser encontrada ao redor dos vasos sanguíneos, principalmente os de pequeno calibre (micro vasos não musculares, capilares e vênulas) (NAG, 1980). Estudos adicionais utilizando microscopia eletrônica adicionaram maiores detalhes à caracterização dos pericitos (NAG, 1980). Como os vasos de pequeno calibre estão presentes em praticamente todos os órgãos, infere-se que pericitos também se distribuem por todos os órgãos. Por estarem associados a pequenos vasos, os pericitos são responsáveis por regular o fluxo sanguíneo e

auxiliar a angiogênese além de formarem uma população de células tronco residentes (HIRSCHI; D'AMORE, 1996).

Apesar de muito utilizadas ainda hoje, a localização e morfologia dos pericitos pode causar confusão ao tentar caracterizar essa população celular. Para contornar essa situação são utilizados marcadores como proteínas de membrana e intracelulares. Além de auxiliar a identificação de pericitos em diferentes microambientes, esses marcadores são úteis em estudos de rastreamento de linhagem, nos quais é possível identificar quais células dão origem a pericitos e em quais células determinados subtipos de pericitos podem se diferenciar (LV; TUAN; CHEUNG; LEUNG, 2014). No entanto, o uso de um único marcador como forma de identificar pericitos não é adequado, uma vez que dependendo de sua origem embrionária, órgão de estudo e potencial de diferenciação essas células podem expressar marcadores variados (VARELA; DÍAZ-FLORES; MARTÍN-VASALLO; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009). Como exemplos de marcadores de pericitos mais comumente utilizados estão a  $\alpha$  actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA, proteína contrátil importante na manutenção do tônus e da permeabilidade vascular) (BANDOPADHYAY; ORTE; LAWRENSON; REID *et al.*, 2001); o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas  $\beta$  (PDGFR $\beta$ , receptor relacionado ao recrutamento de pericitos e angiogênese) (LINDAHL; JOHANSSON; LEVEEN; BETSHOLTZ, 1997; WINKLER; BELL; ZLOKOVIC, 2010) e o proteoglicano neuro-glial 2 (NG2, proteoglicano expresso exclusivamente por pericitos fora do sistema nervoso central) (MORIKAWA; BALUK; KAIDOH; HASKELL *et al.*, 2002; OZERDEM; GRAKO; DAHLIN-HUPPE; MONOSOV *et al.*, 2001).

A função dos pericitos está ligada principalmente a manutenção da homeostase e angiogênese em tecidos saudáveis (RIBATTI; NICO; CRIVELLATO, 2011). Além disso, pericitos são capazes de responder a injúrias em diferentes órgãos. Por exemplo, na medula óssea podem se diferenciar em adipócitos e em injúrias na pele podem se diferenciar em miofibroblastos e produzir matriz extracelular, principalmente colágeno (BIRBRAIR; ZHANG; WANG; MESSI *et al.*, 2015). Baseado na expressão de dois marcadores (NG2 e Nestina), utilizando animais transgênicos, foram descritos dois subtipos de pericitos derivados do músculo esquelético denominados tipo 1 (NG2<sup>+</sup>Nestina<sup>-</sup>) e tipo 2 (NG2<sup>+</sup>Nestina<sup>+</sup>) (**Figura 2**) (BIRBRAIR; ZHANG; FILES; MANNAVA *et al.*, 2014; BIRBRAIR, ALEXANDER; ZHANG, TAN; WANG, ZHONG-MIN; MESSI, MARIA LAURA *et al.*, 2013). Esses pericitos são caracterizados pela capacidade de produção de

colágeno e fibroadipogênese (pericitos tipo 1) e pela participação na angiogênese e potencial de diferenciação em precursores neurais e células musculares esqueléticas (pericitos tipo 2) (BIRBRAIR; ZHANG; FILES; MANNAVA *et al.*, 2014; BIRBRAIR, ALEXANDER; ZHANG, TAN; WANG, ZHONG-MIN; MESSI, MARIA LAURA *et al.*, 2013)



**Figura 2 – Potencial de diferenciação de subtipos de pericitos.** Imagem retirada de Birbrair et al., 2015 (BIRBRAIR; ZHANG; WANG; MESSI *et al.*, 2015)

Foi descrita recentemente uma população celular que expressa NG2 e Nestina na próstata de camundongos (HANOUN; ARNAL-ESTAPÉ; MARYANOVICH; ZAHALKA *et al.*, 2019). Essas células, apesar de não terem sido denominadas pericitos, se encontram abaixo da camada basal do epitélio e próximas aos vasos sanguíneos (HANOUN; ARNAL-ESTAPÉ; MARYANOVICH; ZAHALKA *et al.*, 2019). Em experimentos *in vitro* foi demonstrado que essas células formavam esferoides característicos de células tronco, e passavam a expressar citoqueratina 5 e 18 (CK5 e CK18, marcadores de células basais e luminas respectivamente) (HANOUN; ARNAL-ESTAPÉ; MARYANOVICH; ZAHALKA *et al.*, 2019). Utilizando rastreamento de linhagem *in vivo*, o mesmo trabalho descreveu que um progenitor que expressa NG2 dá origem principalmente a células luminas em condições fisiológicas (HANOUN; ARNAL-ESTAPÉ; MARYANOVICH; ZAHALKA *et al.*, 2019). Além disso, em modelos *in vivo* de injúria por radiação e regressão prostática por castração, foi demonstrado o potencial dessa população celular em reconstituir o epitélio prostático, principalmente as células luminas (HANOUN; ARNAL-ESTAPÉ; MARYANOVICH; ZAHALKA *et al.*, 2019).

Em resumo, já foi demonstrado que pericitos podem ser identificados por marcadores moleculares associados a sua morfologia e localização (ARMULIK; GENOVÉ; BETSHOLTZ, 2011), participam da angiogênese fisiológica e tumoral (BIRBRAIR, ALEXANDER; ZHANG, TAN; WANG, ZHONG-MIN; MESSI, MARIA LAURA *et al.*, 2014), respondem a lesões de formas distintas em diferentes órgãos (BIRBRAIR; ZHANG; WANG; MESSI *et al.*, 2015), tem potencial de diferenciação variável dependendo do estímulo (BIRBRAIR; ZHANG; FILES; MANNAVA *et al.*, 2014) e formam uma população reserva de células tronco na próstata (HANOUN; ARNAL-ESTAPÉ; MARYANOVICH; ZAHALKA *et al.*, 2019). Essas informações ressaltam então a necessidade de se avaliar o papel dos pericitos e como esses podem ser alterados durante a progressão do tumor de próstata.

## **2.6 Pericitos em neoplasias**

Como já foi descrito, pericitos desempenham um papel importante durante a angiogênese, processo essencial no desenvolvimento de tumores sólidos e na disseminação de metástases (FOLKMAN; WATSON; INGBER; HANAHAN, 1989; RAZA; FRANKLIN; DUDEK, 2010). No entanto, por serem extremamente heterogêneos, pericitos podem ser divididos em populações que contribuem para a angiogênese tumoral e para a angiogênese em tecidos saudáveis (RAZA; FRANKLIN; DUDEK, 2010). Além disso, a influência dos pericitos na progressão tumoral não se limita ao tumor primário, e já foi descrito que essas células preparam o nicho pré-metastático no pulmão em modelos de melanoma metastático (MURGAI; JU; EASON; KLINE *et al.*, 2017).

Além de desempenharem diferentes funções no microambiente tumoral, vale ressaltar que pericitos podem derivar, durante o desenvolvimento embrionário, de diferentes fontes de células tronco (ARMULIK; GENOVÉ; BETSHOLTZ, 2011; YAMAZAKI; NALBANDIAN; UCHIDA; LI *et al.*, 2017). A migração de pericitos dos folhetos embrionários para diferentes órgãos em seus estados prematuros ocorre por um fenômeno similar à transição epitélio-mesênquima (TEM) (THIERY; ACLOQUE; HUANG; NIETO, 2009). A TEM é um processo amplamente descrito em neoplasias por ser uma reprogramação das células neoplásicas que aumenta a capacidade migratória e invasiva dessas células (KALLURI; WEINBERG, 2009; LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014). Em um trabalho de 2016, Shenoy e colaboradores mostraram que, surpreendentemente, algumas células neoplásicas passavam pela TEM e, ao invés de invadirem

vasos sanguíneos e formarem metástases, permaneciam no espaço perivascular e expressavam marcadores clássicos de pericitos (SHENOY; JIN; LUO; TANG *et al.*, 2016).

Em tumores de próstata a importância da microvasculatura já é descrita como um fator prognóstico importante (FRANCK LISSBRANT, 2001). Pericitos são responsáveis por estabilizar a microvasculatura nos tumores, que em geral tem forma e função anormais (MORIKAWA; BALUK; KAIDOH; HASKELL *et al.*, 2002). Dessa forma, foi descrito que a angiogênese tumoral pode ser diminuída utilizando pericitos como alvo terapêutico (OZERDEM, 2006). Portanto, o estudo dos pericitos no microambiente tumoral é importante, visto que os mesmos podem contribuir para o desenvolvimento de tumores por participarem da angiogênese tumoral, por aumentarem sua quantidade devido à diferenciação de células tumorais em pericitos e prepararem o nicho pré-metastático para receber células que se destacam do tumor primário. No entanto, por serem elementos chave do microambiente tumoral, pericitos também devem ser explorados quanto ao seu potencial terapêutico, principalmente como alvo para terapias anti-angiogênicas.

### **3. Justificativa**

O câncer de próstata é o tipo de câncer mais comum nos homens, e uma importante causa de morbidade e mortalidade masculina no Brasil e no mundo sendo, portanto, um tipo de câncer de alta relevância para pesquisa. Sendo assim, o presente trabalho se justifica pela necessidade de melhor entender e estudar o papel dos pericitos no câncer de próstata como um componente do microambiente tumoral, visto a sua participação no processo de angiogênese, fenômeno marcante na progressão tumoral. Adicionalmente, o uso de modelos animais para o estudo do microambiente tumoral é essencial, pois fornece alternativas para se avaliar a complexidade do desenvolvimento tumoral em animais padronizados e monitorados durante suas gerações, que compartilham similaridades genéticas e fisiológicas com os humanos.

### **4. Hipótese**

A expressão gênica de pericitos no microambiente da próstata é alterada em lesões pré-malignas, favorecendo a promoção e progressão neoplásica.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo geral

Comparar a expressão gênica dos pericitos da próstata de camundongos Hi-Myc<sup>+</sup> com lesões neoplásicas intraepiteliais com a expressão gênica dos pericitos da próstata de animais saudáveis Hi-Myc<sup>-</sup>, assim como quantificar os pericitos em próstatas de animais Hi-Myc<sup>+</sup> com lesão neoplásica intraepitelial.

### 5.2 Objetivos específicos

- Padronizar o isolamento de pericitos da próstata de animais NG2-DsRed<sup>+</sup> por citometria de fluxo.
- Avaliar a expressão de genes relacionados ao câncer de próstata nos pericitos isolados de animais com diferentes graus de lesão prostática (NG2-DsRed<sup>+</sup>/Hi-Myc<sup>+</sup>) e de animais saudáveis (NG2-DsRed<sup>+</sup>/Hi-Myc<sup>-</sup>).
- Correlacionar a expressão gênica dos pericitos isolados de animais NG2-DsRed<sup>+</sup>/Hi-Myc<sup>+</sup> ao grau das lesões prostáticas.
- Quantificar o número e a área de cobertura de pericitos em diferentes graus de lesão prostática em animais NG2-DsRed<sup>+</sup>/Hi-Myc<sup>+</sup>
- Estabelecer o valor prognóstico dos genes avaliados utilizando base de dados de sequenciamento disponibilizada publicamente pela UCSC.
- Quantificar os pericitos em próstatas de animais Hi-Myc<sup>+</sup> com lesão.

## 6. Materiais e métodos

### 6.1. Animais

Foram utilizados animais Hi-Myc (ELLWOOD-YEN; GRAEBER; WONGVIPAT; IRUELA-ARISPE *et al.*, 2003) (Frederick National Laboratory, código 01XK8) mantidos no background C57BL/6 que expressam o oncogene c-Myc em células epiteliais da próstata controlado pelo

promotor de probasina associado a um elemento de resposta secundária a andrógenos (ARR2Pb). Animais Hi-myc foram genotipados utilizando primers com as sequências: Forward: 5'-AACATGATGACTACCAAGCTTGGC-3'; Reverse 5'-ATGATAGCATCTTGTTCCTTAGTCTTTTTCTTAATAGGG-3'. Também foram utilizados animais NG2-DsRed (ZHU; BERGLES; NISHIYAMA, 2008) (The Jackson Laboratory, código 008241) mantidos no background C57BL/6 que expressam fluorescência vermelha (DsRed) exclusivamente em células que expressam NG2 (pericitos).

Animais Hi-Myc<sup>+</sup> foram cruzados com animais NG2-DsRed<sup>+</sup>, sendo utilizados tanto machos quanto fêmeas possuindo o genótipo ou fenótipo desejado. Ao atingirem 1 mês de idade a prole obtida pelo cruzamento foi separada por sexo e foi retirado um fragmento do rabo dos animais para extração de DNA genômico e genotipagem por PCR convencional para o gene Hi-Myc (**Figura 3A e B**). Adicionalmente, foi retirado um fragmento da orelha dos animais para fenotipagem em microscópio de fluorescência (Evos XL-Core, ThermoFisher), onde foi detectada a presença de fluorescência DsRed. Animais machos foram separados em grupos experimentais e controle conforme a combinação do seu genótipo e fenótipo e receberam água e comida à vontade, sendo eutanasiados ao completarem 6 ou 12 meses de idade. Todos os procedimentos desse trabalho envolvendo animais foram aprovados pelo comitê de ética em uso de animais da UFMG sob número CEUA 187/2017 (**Anexo 1**).

## 6.2 Análises histológicas

As análises histológicas foram feitas a partir de cortes de tecidos prostáticos incluídos em parafina. Para inclusão em parafina, a próstata dos animais (n=3 por grupo) foi dissecada e fixada por 24 horas em formol 10% tamponado a temperatura ambiente. Depois de fixados, os tecidos foram desidratados em banhos com concentrações crescentes de etanol e xilol, embebidos em parafina líquida aquecida e incluídos em parafina. Foram feitas seções histológicas de 4 µm, que foram diafanizadas, reidratadas e coradas em hematoxilina e eosina para análise.

## 6.3 Microscopia confocal

A fim de manter a fluorescência endógena dos animais, a análise por microscopia confocal foi realizada em cortes congelados. Para cortes congelados, as próstatas dos animais (n=3 por grupo) foram dissecadas e fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS (pH=7,4) em geladeira por 24



horas. Os tecidos fixados foram então embebidos em sucrose a 30% em PBS (pH=7,4) por 24 horas, incluídos em OCT e imediatamente congelados em isopentano resfriado com gelo seco. Foram feitos cortes de 20  $\mu\text{m}$  em criostato (-25 a -20  $^{\circ}\text{C}$ ) que foram corados com DAPI e analisados em microscópio confocal (Zeiss LSM880) nas instalações do Centro de Aquisição e Processamento de Imagem (CAPI) do ICB, UFMG.

### **6.3.1 Aquisição de imagens e análise**

Todas as imagens utilizadas na quantificação foram capturadas nas mesmas condições (objetiva de 40x com imersão a óleo, resolução 2048x2048, zoom de 1.4) para obter o sinal ótimo necessário para análise. Para as imagens representativas (Figura 2X e Y) foram utilizadas as mesmas condições, porém com zoom de 0.6. Para detecção do marcador de núcleo (DAPI) foi utilizado o laser Diodo (405 nm) e para detecção da fluorescência endógena foi utilizado o laser HeNe543 (543 nm). Foram adquiridas 5 imagens de cada animal (n=3) de campos onde eram identificados ácinos prostáticos em série-Z compostas por 11 planos focais obtidos a cada 1  $\mu\text{m}$ , em cada plano focal o campo era scaneado pelos dois lasers separadamente.

Para a contagem do número de pericitos foi utilizada a ferramenta “Projeção ortogonal” do software Fiji/ImageJ. Foram contados, em cada plano focal, núcleos corados com DAPI que se colocalizavam com a fluorescência endógena DsRed. Para determinar a área de cobertura dos pericitos as imagens em série-Z foram agrupadas em função da intensidade máxima de fluorescência de cada plano focal no software Fiji/ImageJ e os canais de fluorescência foram separados. Foi utilizado o canal 2, que corresponde à fluorescência endógena isoladamente. A imagem foi, então, transformada em imagem binária e a área foi calculada pelo software Fiji/ImageJ. Para quantificação por área, foi utilizada a área do campo (151,82x151,82  $\mu\text{m} = 23,049.3124 \mu\text{m}^2$ ).

### **6.4 Isolamento de pericitos por FACS**

O procedimento foi adaptado do protocolo descrito por Zahalka e colaboradores (ZAHALKA; ARNAL-ESTAPÉ; MARYANOVICH; NAKAHARA *et al.*, 2017). A próstata dos animais foi dissecada (n=3 por grupo) e as células passaram por dissociação enzimática feita em mix de Colagenase I (2,5 mg/mL) + Dispase (0,6 mg/mL) a 37  $^{\circ}\text{C}$  por 45 minutos. O isolamento de pericitos por FACS pode ser baseado nas propriedades celulares de tamanho e granulosidade,

além da expressão de diferentes marcadores. Após a dissociação a suspensão de células foi corada com reagente de viabilidade (Live/Dead Violet) e não foram caracterizados danos mensuráveis durante o processo. Foi realizado sorting para separar pericitos com base na fluorescência do marcador Live/Dead (detectado no canal DAPI-A) e da fluorescência endógena DsRed (detectada no canal PE-A) com uma pureza de separação de 98,5%.

Durante o sorting ocorre a aplicação de vibrações ultrassônicas à suspensão celular (flow cell) que induz a formação de gotas (droplets). As gotas que possuem, em seu interior, as células de interesse, passam por um pulso elétrico onde recebem uma carga (positiva ou negativa) ou permanecem sem carga de acordo com os critérios estabelecidos previamente no software. Em seguida, as gotas carregadas passam por um campo magnético formado por duas placas eletricamente carregadas. De acordo com sua polaridade, as gotas são defletidas para direita ou para esquerda e são recolhidas em tubos coletores. A aquisição foi realizada utilizando o citômetro FACS Aria II e o software FACS Diva, os dot-plots foram feitos utilizando o software FlowJo.

### **6.5 Extração de RNA e RT-PCR**

O RNA total das amostras foi isolado imediatamente após o isolamento das células por FACS utilizando o kit RNeasy Mini (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante e convertido imediatamente em cDNA utilizando o kit First Strand (Qiagen), também de acordo com o protocolo do fabricante. A qualidade do cDNA, as condições dos reagentes e do equipamento foram avaliados utilizando placas de controle de qualidade fornecidas pela empresa Qiagen (PAMM-999ZR).

### **6.6 qPCR**

Foi avaliada a expressão de 84 genes alvo relacionados ao câncer de próstata em um painel pré-estabelecido pela empresa Qiagen (PAMM-135ZR). Foi utilizado MasterMix com SYBR Green-ROX para detecção da amplificação, que foi detectada utilizando o equipamento Rotor GeneQ fornecido pela empresa Qiagen. A sequência dos primers utilizados não foi fornecida. A expressão gênica dos alvos foi normalizada utilizando o Ct médio de 5 normalizadores e a diferença na expressão foi calculada pela razão entre o grupo com teste (cMyc<sup>+</sup>) e o grupo

controle (cMyc<sup>-</sup>). A análise contava também com um controle de contaminação com DNA genômico (MGDC), qualidade da reação de RT-PCR (RTC) e controles positivos de PCR (PPC).

## 6.7 Curvas de sobrevida

As curvas de sobrevida foram geradas pelo banco de dados da Universidade da Califórnia Santa Cruz (UCSC Xena), que tem como base dados coletados do TCGA (The Cancer Genome Atlas) obtidos em Janeiro de 2016. O dataset utilizado foi o TCGA.PRAD.sampleMap/HiSeqV2\_percentile disponível para acesso online e download em <https://tcga.xenahubs.net> (link para acesso da base de dados). Brevemente, o dataset compila dados de sequenciamento de RNA de 550 amostras de adenocarcinoma de próstata. Foram geradas curvas de sobrevida para um intervalo de cinco anos e os grupos foram divididos em “Alta expressão” e “Baixa expressão” de cada gene. A diferença estatística entre os grupos é calculada utilizando o log-rank test e valores de  $p < 0,05$  indicam diferença significativa (GOLDMAN; CRAFT; HASTIE; REPEČKA *et al.*, 2019).

## 6.8 Análise estatística

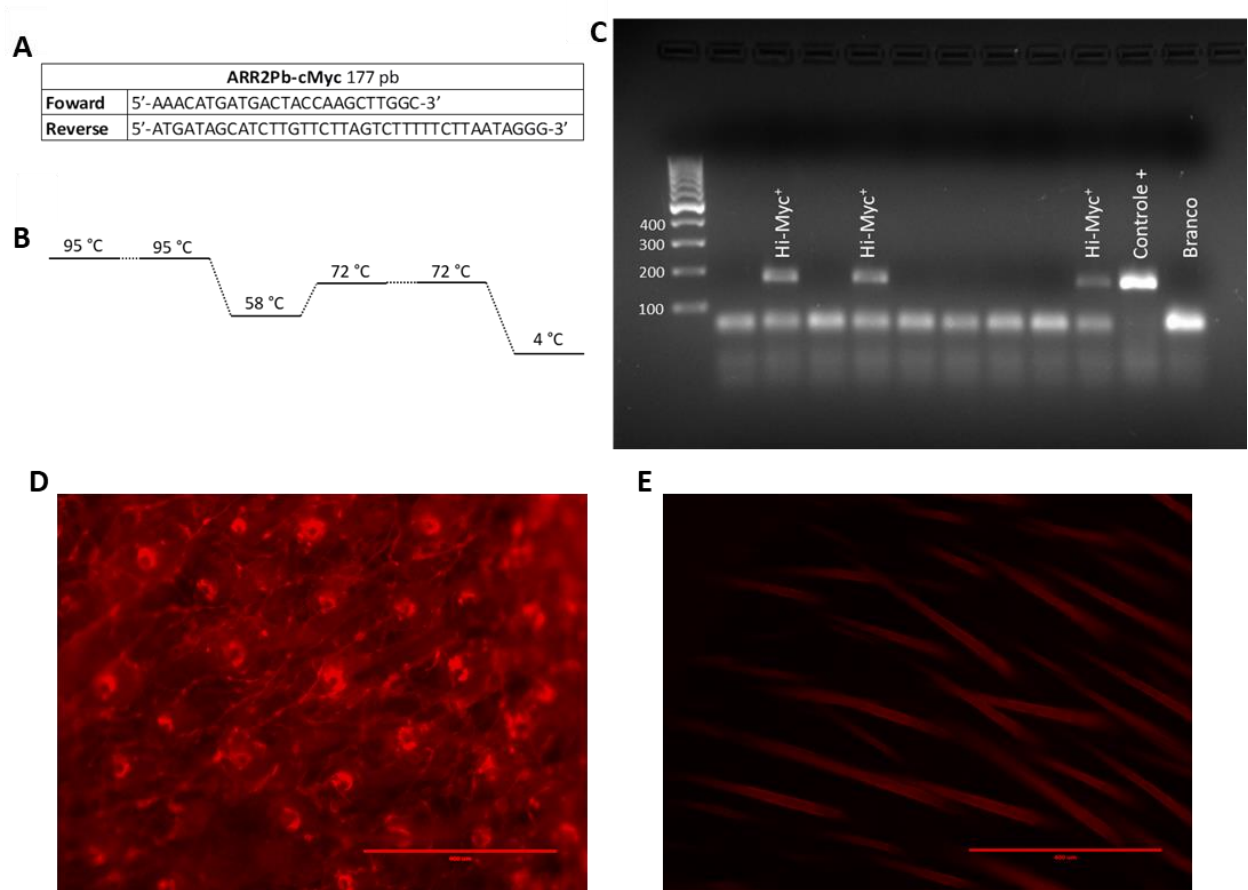
Todos os dados estão representados como média  $\pm$  SEM. Dados de expressão gênica são representativos de apenas uma reação de qPCR com material (cDNA) proveniente de pericitos isolados de 3 próstatas de cada grupo. A análise do número e da área de cobertura de pericitos foi feita utilizando teste t não pareado com \*  $p < 0,05$ . Todos os gráficos e análises foram feitos utilizando GraphPad Prism v7.

## 7. Resultados

### 7.1 Separação de grupos em função do genótipo e fenótipo

A genotipagem da prole obtida pelo cruzamento de animais Hi-Myc<sup>+</sup> e NG2DsRed<sup>+</sup> possibilitou identificar animais que expressavam o oncogene c-Myc (Hi-Myc<sup>+</sup>) e animais que não expressavam esse oncogene (Hi-Myc<sup>-</sup>) pela visualização do produto da PCR em gel de agarose 1,5% (**Figura 3C**). Pela visualização em microscópio de fluorescência dos fragmentos de orelha dos animais também foi possível identificar animais que expressavam fluorescência (DsRed<sup>+</sup>) (**Figura 3D**) e animais que não expressavam fluorescência (DsRed<sup>-</sup>) (**Figura 3E**). A partir da

combinação de genótipo e fenótipo, os animais foram divididos em grupos teste e controle. Em resumo, animais duplo transgênicos (teste - NG2-DsRed<sup>+</sup>/Hi-Myc<sup>+</sup>) desenvolviam lesões prostáticas e tinham pericitos marcados com fluorescência vermelha, enquanto animais que não expressavam Hi-Myc (controle - NG2-DsRed<sup>+</sup>/Hi-Myc<sup>-</sup>) foram usados como controle por não desenvolverem lesões, mas possuírem pericitos fluorescentes. Animais que não possuíam fluorescência foram usados para as análises histológicas de HE de próstatas com lesão (teste - NG2-DsRed<sup>-</sup>/Hi-Myc<sup>+</sup>) e sem lesão (controle - NG2-DsRed<sup>-</sup>/Hi-Myc<sup>-</sup>)



**Figura 3 – Genotipagem e fenotipagem dos animais**

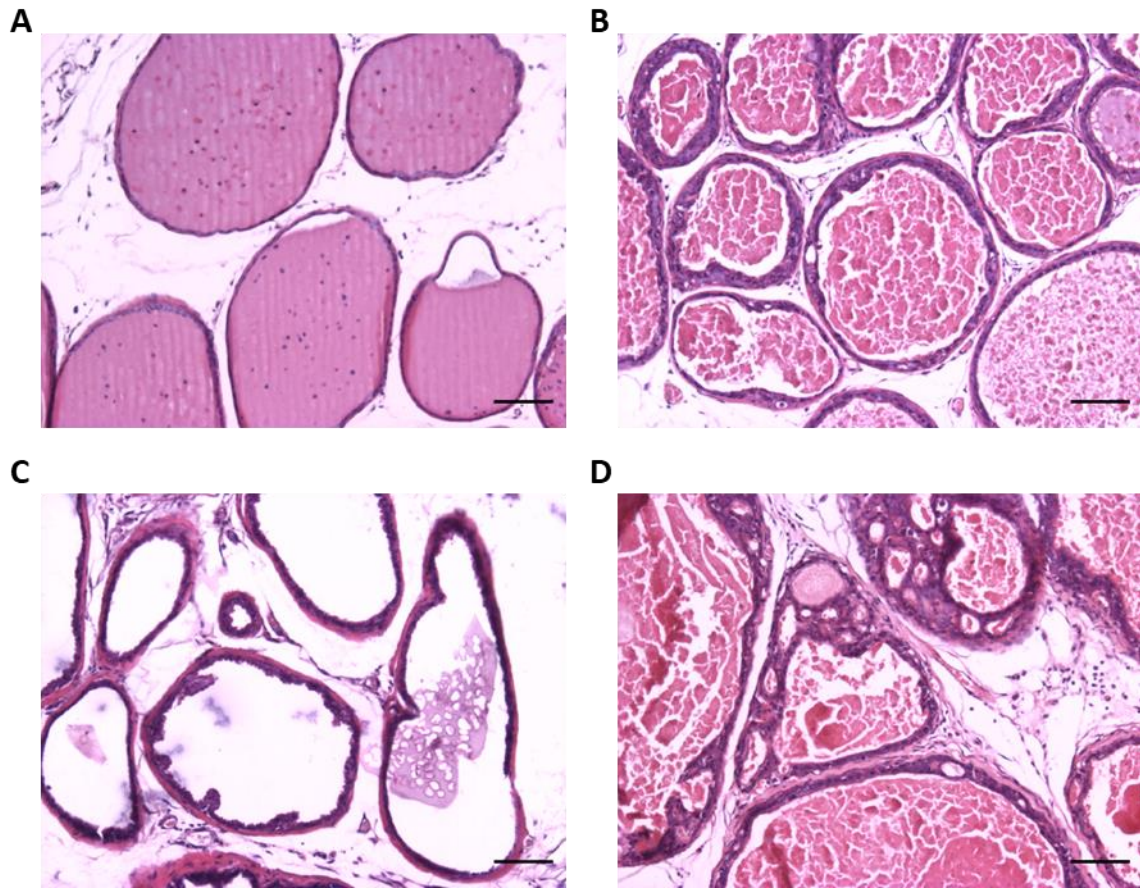
**A.** Sequência de *primers* utilizados para PCR convencional (ELLWOOD-YEN; GRAEBER; WONGVIPAT; IRUELA-ARISPE *et al.*, 2003); **B.** Ciclo de temperaturas utilizado na PCR convencional para genotipagem; **C.** Imagem representativa de gel de agarose 1,5% para visualização do resultado da PCR. O tamanho das bandas do padrão de peso molecular (pares de bases), amostras positivas para o gene, controle positivo e branco estão indicados na imagem. Amostras positivas apresentam banda de aproximadamente 177 pares de bases; **D.** Imagem representativa da fluorescência endógena em fragmento de orelha de animal positivo para DsRed; **E.** Imagem representativa da fluorescência endógena em fragmento de orelha de animal negativo para DsRed.

## 7.2 Desenvolvimento de lesões intraepiteliais em camundongos Hi-Myc

O modelo Hi-Myc para estudo do câncer de próstata foi desenvolvido em camundongos com fundo genético FVB (ELLWOOD-YEN; GRAEBER; WONGVIPAT; IRUELA-ARISPE *et al.*, 2003). Para os experimentos desse trabalho esses animais foram cruzados com animais C57 BL/6 por no mínimo oito gerações, mudando assim o fundo genético para esse último. Camundongos FVB e C57 BL/6 respondem diferentemente a algumas lesões (FRIDMAN; PAGÈS; SAUTÈS-FRIDMAN; GALON, 2012; WILHELM; RITTER; LABBOW; DONHAUSER *et al.*, 2001). Portanto, foi realizada uma avaliação histológica das próstatas dos animais para verificar a progressão da neoplasia nesse modelo.

Foi avaliado que, aos seis meses de idade, animais que não expressavam o gene c-Myc mutado (Hi-Myc<sup>-</sup>) apresentavam próstatas histologicamente normais (**Figura 4A**) com epitélio simples delimitado pela membrana basal. Animais Hi-Myc<sup>-</sup> aos 12 meses de idade apresentavam ácinos hiperplásicos (**Figura 4C**). Animais que expressavam o gene c-Myc (Hi-Myc<sup>+</sup>), aos seis meses de idade, apresentavam ácinos altamente hiperplásicos com projeções e espessamento da camada de células epiteliais caracterizando uma neoplasia intraepitelial de baixo grau (LGPIN) (**Figura 4B**). Animais Hi-Myc<sup>+</sup> aos 12 meses de idade apresentavam neoplasia intraepitelial de alto grau (HGPIN), caracterizada pela presença de projeções, espessamento da camada de células epiteliais e formação de vacúolos contendo secreção (**Figura 4D**).

Foi avaliado também que os ácinos prostáticos de animais Hi-Myc<sup>+</sup> de 6 e 12 meses apresentavam membrana basal íntegra. Além disso, outros órgãos analisados (pulmão, cérebro e baço) não apresentavam metástases em nenhum dos tempos avaliados (dados não mostrados).



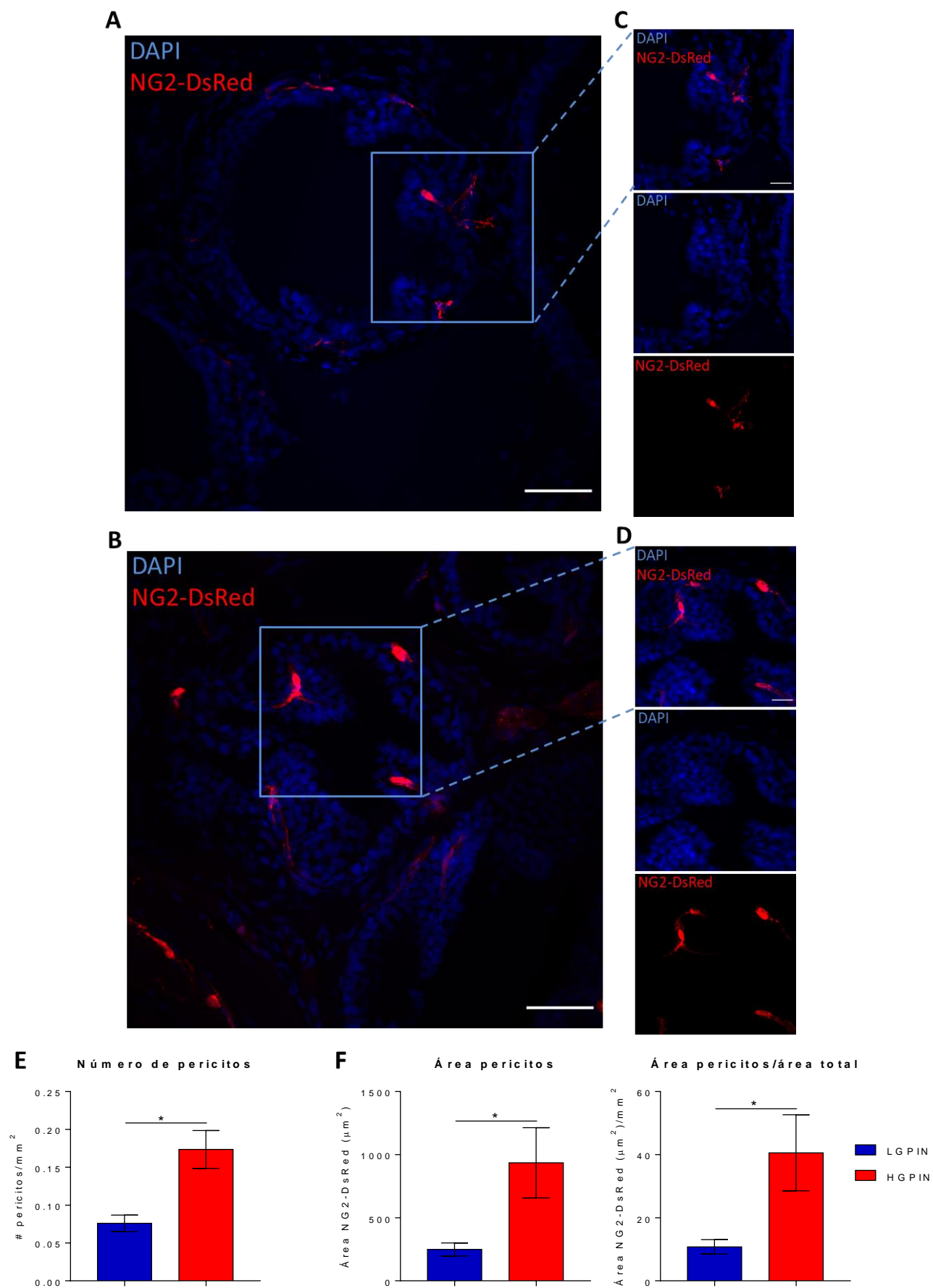
**Figura 4 – Histologia da próstata de animais Hi-Myc<sup>-</sup> e Hi-Myc<sup>+</sup>**

**A.** Imagem em HE representativa da próstata de animais saudáveis (Hi-Myc<sup>-</sup>) com 6 meses de idade, apresentando epitélio simples e membrana basal íntegra; **B.** Imagem em HE representativa da próstata de animais Hi-Myc<sup>+</sup> com 6 meses de idade, apresentando lesões de baixo grau (LGPIN) caracterizadas pelo espessamento do compartimento; **C.** Imagem em HE representativa da próstata de animais saudáveis (Hi-Myc<sup>-</sup>) com 12 meses de idade, apresentando ácinos hiperplásicos e membrana basal íntegra; **D.** Imagem em HE representativa da próstata de animais Hi-Myc<sup>+</sup> com 12 meses de idade, apresentando ácinos com lesões de alto grau (HGPN) e vacúolos no compartimento epitelial, reatividade estromal e membrana basal íntegra.

### 7.3 Quantificação de pericitos em lesões prostáticas

A quantidade e a área de cobertura de pericitos foi avaliada em LGPIN e HGPIN de animais NG2-DsRed<sup>+</sup>/Hi-Myc<sup>+</sup> (**Figura 5A e B**). Foi observado que os pericitos com fluorescência endógena estavam presentes nas lesões que se projetavam para o interior dos ácinos, mas permaneciam logo abaixo da camada de células epiteliais (**Figura 5C e D**). Em HGPIN de animais com 12 meses de idade também foi verificado um aumento do número de pericitos em relação a lesões de baixo grau (**Figura 5E**). Além disso, as HGPIN apresentavam uma maior área de cobertura de pericitos do que as LGPIN (**Figura 5F**).





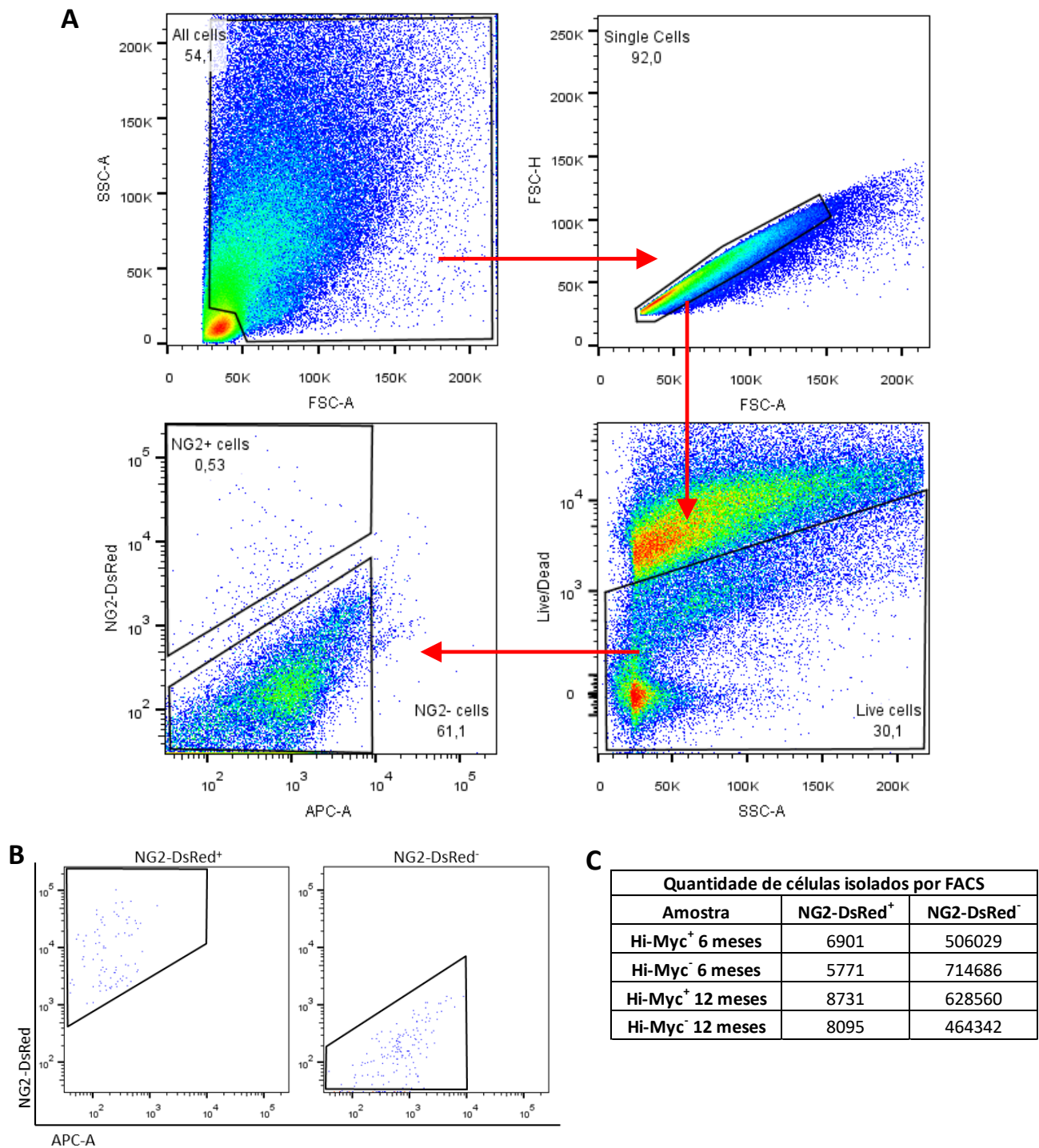
**Figura 5 – Pericitos em lesões prostáticas de baixo e alto grau (página anterior)**

**A.** Imagem em aumento de 40x com zoom de 0.6 representando ácino com LGPIN em animais NG2-DsRed<sup>+</sup>/Hi-Myc<sup>+</sup> com 6 meses de idade. Barra de escala 50 µm; **B.** Imagem em aumento de 40x com zoom de 0.6 representando ácino com HGPIN em animais NG2-DsRed<sup>+</sup>/Hi-Myc<sup>+</sup> com 12 meses de idade. Barra de escala 50 µm; **C.** Inseto da imagem A (aumento de 40x com zoom de 1.4) mostrando em detalhe a presença de pericitos na LGPIN. Barra de escala 20 µm; **D.** Inseto da imagem B (aumento de 40x com zoom de 1.4) mostrando em detalhe a presença de pericitos na HGPIN. Barra de escala 20 µm; **E.** Quantificação do número de pericitos por área (LGPIN 0.07592±0.01085; HGPIN 0.1735±0.02505); **F.** Quantificação da área de cobertura de pericitos (LGPIN 293.1±37.42; HGPIN 1191±187.9) e da área de cobertura pela área total do campo (LGPIN 10.78±2.251; HGPIN 51.69±8.153); **A, B, C e D:** Núcleos marcados com DAPI (azul) e pericitos com fluorescência endógena DsRed (vermelho). **E e F:** Dados apresentados como média ± SEM. Teste t não pareado (\* p<0.05).

#### 7.4 Padronização do isolamento de pericitos por FACS

Pericitos foram isolados da próstata de animais NG2-DsRed<sup>+</sup>/Hi-Myc<sup>-</sup> e NG2-DsRed<sup>+</sup>/Hi-Myc<sup>+</sup> com base na expressão de fluorescência endógena. Para isso, foi adaptado um protocolo estabelecido por Zahalka e colaboradores em parceria com o instituto René Rachou (Fiocruz Minas) (ZAHALKA; ARNAL-ESTAPÉ; MARYANOVICH; NAKAHARA *et al.*, 2017). Após selecionar *singlets* e excluir células mortas, foram obtidas células que expressavam fluorescência (NG2-DsRed<sup>+</sup>) e células que não expressavam (NG2-DsRed<sup>-</sup>) (**Figura 6A**).

A análise do pós-*sorting* mostrou duas populações com fluorescências distintas (**Figura 6B**) e o número de células obtidas em cada população foi quantificado (**Figura 6C**). A população NG2-DsRed<sup>+</sup> representava apenas pericitos, pois outras células que não possuem o promotor de NG2 ativado não expressam fluorescência DsRed. No entanto, a população NG2-DsRed<sup>-</sup> era composta por outros tipos celulares que não serão descritos neste trabalho. Dessa forma, foi possível obter uma população pura de pericitos com a metodologia adotada, que foi utilizada para análise de expressão gênica.



**Figura 6 – Padronização do isolamento de pericitos por citometria de fluxo**

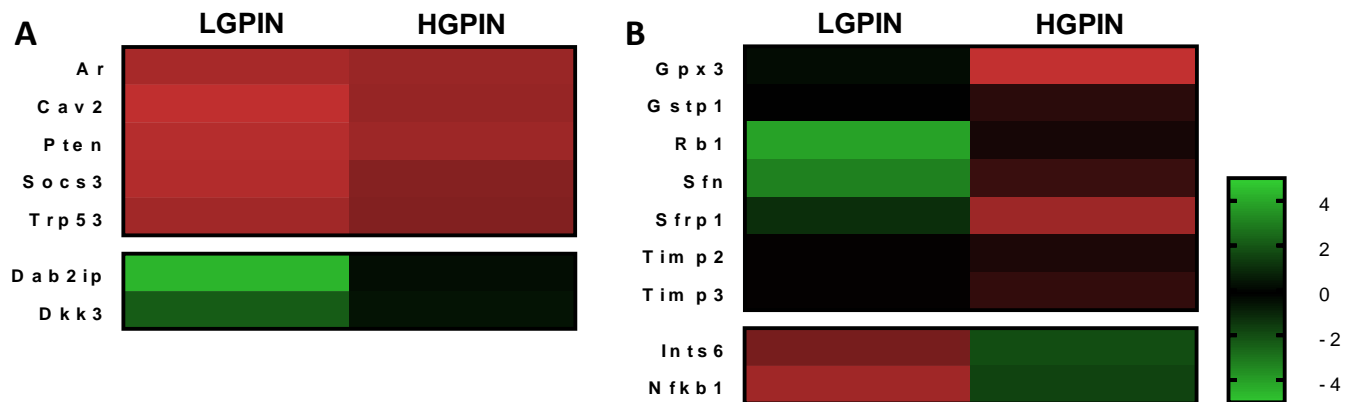
**A.** Estratégia de *gating* utilizada para separação de pericitos; **B.** Análise de pós-*sorting* demonstrando as duas populações isoladas com base na fluorescência endógena DsRed; **C.** Quantidade de pericitos NG2-DsRed<sup>+</sup> e outras células NG2-DsRed<sup>-</sup> isoladas de cada grupo.

### 7.5 Expressão gênica de pericitos

Foram avaliados, em pericitos isolados por FACS (NG2-DsRed<sup>+</sup>), um painel de 84 genes alvo relacionados ao câncer de próstata, além de normalizadores, controles de contaminação por DNA genômico e controles positivos da PCR (**Anexo 2**). A expressão gênica foi normalizada utilizando o C<sub>t</sub> médio de dois genes normalizadores (B2M e  $\beta$ -Actina). O cálculo do fold-change foi realizado utilizando como controle o  $\Delta\Delta C_t$  de pericitos isolados de próstatas saudáveis de animais com idades equivalentes à dos animais com lesões prostáticas (6 meses para LGPIN e 12 meses para HGPIN).

Dentre os genes analisados, cinco apresentaram um aumento da expressão (AR, Cav2, Pten, Trp53 e Socs3) e dois apresentaram redução da expressão (DAb2ip e Dkk3) tanto em LGPIN quando em HGPIN. Portanto, foi observado um aumento na expressão de genes relacionados às funções fisiológicas da próstata (AR), regulação da apoptose (Cav2), controle do ciclo celular e reparo de DNA (Pten e Trp53) e regulação da transcrição (Socs3), bem como uma redução na expressão de genes supressores de tumor (Dab2ip e Dkk3) (**Figura 7A**).

Outros genes supressores de tumor (Gpx3, Gstp1, Rb1, Sfn e Sfrp1) e genes relacionados ao remodelamento da matriz extracelular (Timp2 e Timp3) apresentaram expressão reduzida em LGPIN, entretanto, apresentaram expressão aumentada em HGPIN. De forma contrastante, um gene supressor de tumor (Ints6) e um gene ligado à progressão tumoral na próstata (Nfkb1) apresentaram expressão aumentada em LGPIN e expressão diminuída em HGPIN (**Figura 7B**).

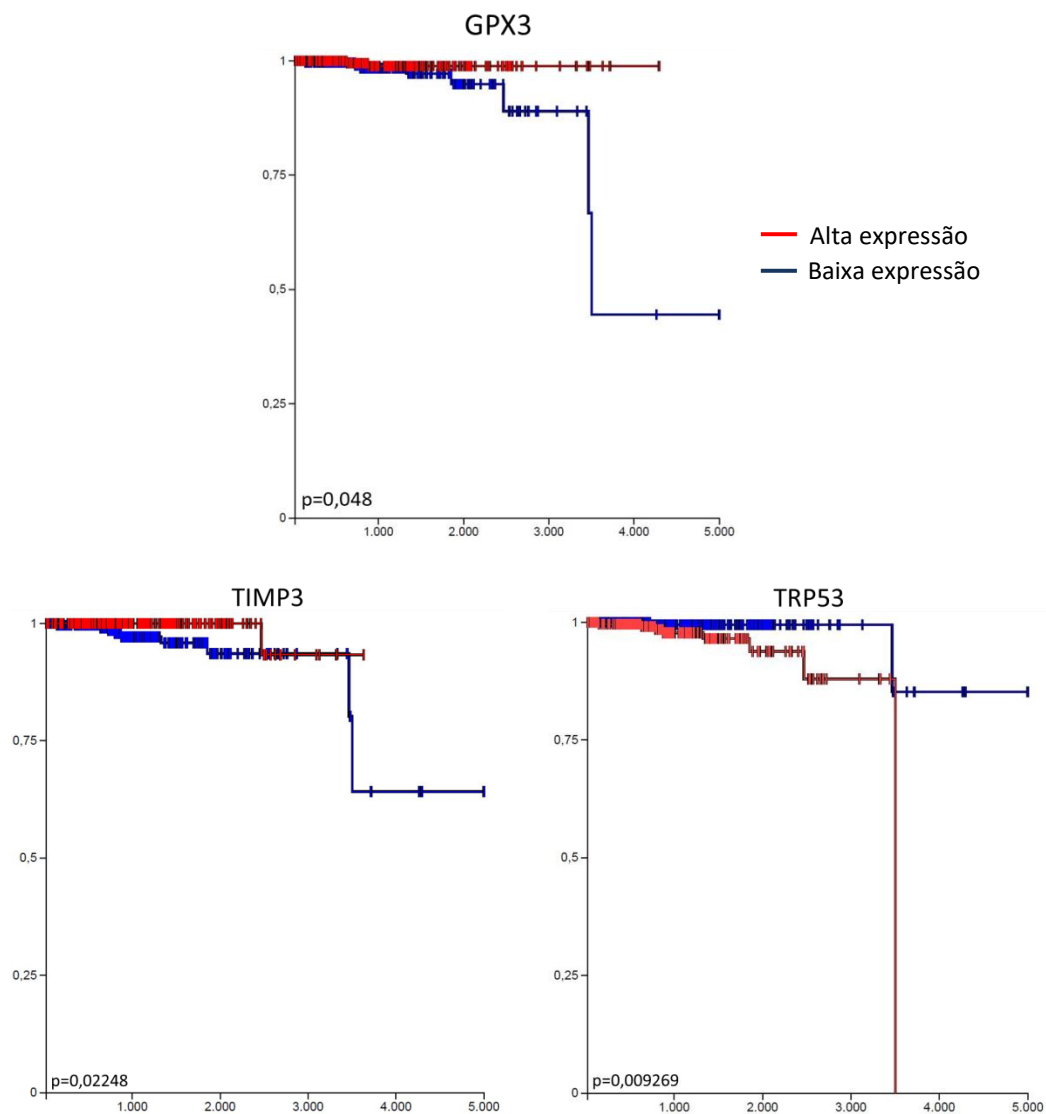


**Figura 7 – Expressão de genes em lesões prostáticas de baixo e alto grau**

**A.** Genes que mantiveram expressão constante durante a progressão da lesão. Os genes Ar, Cav2, Pten, Socs3 e Trp53 apresentaram um aumento da expressão, enquanto os genes Dab2ip e Dkk3 apresentaram uma redução na expressão; **B.** Genes que variaram sua expressão com a progressão da lesão. Os genes Gpx3, Gstp1, Rb1, Sfn, Sfrp1, Timp2 e Timp3 aumentaram sua expressão em lesões de alto grau. De forma contrária, os genes Ints6 e Nfkb1 diminuíram sua expressão em lesões de alto grau. A graduação de cores foi feita com base no fold-change dos genes. Vermelho marca genes superexpressos e verde marca genes pouco expressos.

## 7.6 Relação dos genes com sobrevida

Para avaliar a relação dos genes avaliados nesse trabalho com a sobrevida de pacientes com adenocarcinoma de próstata foi utilizada uma base de dados disponibilizada publicamente na plataforma UCSCXena (GOLDMAN; CRAFT; HASTIE; REPEČKA *et al.*, 2019). Pacientes com baixa expressão de Cav2, Dkk3, Dab2ip, Gpx3, Pten, Gstp1, Rb1, Timp2, Timp3, Socs3, Sfn e Sfrp1 demonstravam menor sobrevida, porém sem diferença significativa quando comparados a pacientes com alta expressão (**Anexo 3**). Além disso, a baixa expressão dos genes Ar, Nfkb1, Trp53 e Ints6 se relacionam a uma maior sobrevida. No entanto, foi observada diferença entre os grupos categorizados pela expressão (“alta” e “baixa”) apenas para os genes Gpx3, Timp3 e Trp53 (**Figura 8**).



**Figura 8 – Sobrevida de pacientes com câncer de próstata acompanhada por 5 anos**

Representação da sobrevida de pacientes relacionada à expressão dos genes Gpx3, Timp3 e Trp53. O valor de p demonstra diferença significativa entre os grupos “Alta expressão” e “Baixa expressão” (GOLDMAN; CRAFT; HASTIE; REPEČKA *et al.*, 2019).



## 8. Discussão

Diferentes modelos são utilizados para estudar o desenvolvimento de neoplasias, dentre elas o adenocarcinoma de próstata, uma das principais neoplasias que acometem a população masculina. Alguns modelos apresentam vantagens frente a outros pelos mais diversos motivos. Utilizando o modelo transgênico para o estudo do câncer de próstata estabelecido por Ellwood-Yen, porém em um fundo genético C57 BL/6, foi possível demonstrar um atraso no desenvolvimento do câncer de próstata induzido pela superexpressão do oncogene c-Myc. Dados da literatura e dados ainda não publicados do nosso grupo corroboram com esses achados. Sendo descrito que, ao invés de desenvolver neoplasias aos 6 meses de idade, como descrito por Ellwood-Yen, o modelo Hi-Myc no fundo genético C57 BL/6 desenvolve PIN aos 6 meses e neoplasia prostática entre 12 e 15 meses (ELLIS; KU; LI; AZABDAFTARI *et al.*, 2016; ELLWOOD-YEN; GRAEBER; WONGVIPAT; IRUELA-ARISPE *et al.*, 2003). A descrição histológica de lesões pré-malignas como PIN já vem sendo utilizada por sua importância no diagnóstico e na prevenção do câncer de próstata. Isso ressalta então a necessidade de utilizar modelos que representem com acurácia o desenvolvimento dessas lesões, possibilitando caracterizar as mudanças do microambiente que o tornam propícios para o surgimento de neoplasias (BOSTWICK; MONTIRONI; SESTERHENN, 2000; BOSTWICK; BRAWER, 1987; BOSTWICK; QIAN, 2004).

A presença de pericitos associados à vasculatura do microambiente tumoral deve ser avaliada com cautela. Welén e colaboradores, em 2009, demonstraram que a área de cobertura de pericitos em vasos do tumor está associada inversamente ao potencial invasivo das células neoplásicas na corrente sanguínea (WELÉN; JENNBÄCKEN; TEŠAN; DAMBER, 2009). Além disso, um aumento no número de pericitos no microambiente tumoral pode estar relacionado a um aumento das características de célula tronco das próprias células neoplásicas (SHENOY; JIN; LUO; TANG *et al.*, 2016). Portanto, um aumento no número e na área de cobertura de pericitos não está claramente relacionado a um melhor ou pior prognóstico, sendo necessário se avaliar mais a fundo a causa desse aumento. Em lesões como PIN, cabe ainda avaliar qual o efeito do aumento no número e na área de cobertura de pericitos na transição para lesões malignas.

A análise por qPCR neste trabalho mostrou que, até certo ponto, pode haver um controle da expressão gênica de pericitos pelo microambiente da PIN. No entanto, outros elementos devem ser avaliados. Vários genes avaliados nesse trabalho podem ser controlados por metilação,

processo que se relaciona com as características clínicas do tumor de próstata e tem influência no prognóstico desse tumor (SINGAL; FERDINAND; REIS; SCHLESSELMAN, 2004). Portanto, genes supressores de tumor que passaram a ser mais expressos em PINs mais avançados podem estar sendo silenciados, por exemplo, *Gpx3*, *Gstp1*, *Sfn* (HENRIQUE; JERÓNIMO; HOQUE; CARVALHO *et al.*, 2005; SONG; STIRZAKER; HARRISON; MELKI *et al.*, 2002; YAN; YU; TSENG; CIEPLY *et al.*, 2007), contribuindo assim para o crescimento do tumor. Da mesma forma, tanto genes que eram pouco expressos (*Dkk3* e *Dab2ip*) quanto genes que eram muito expressos (*Socs3*) em ambos os graus de PIN estão sujeitos a controles epigenéticos que influenciam no desenvolvimento tumoral (CHEN; TOYOOKA; GAZDAR; HSIEH, 2003; PIERCONTI; MARTINI; PINTO; CENCI *et al.*, 2011; VEECK; WILD; FUCHS; SCHÜFFLER *et al.*, 2009). Vale ressaltar que este trabalho avaliou apenas genes expressos por pericitos isolados do microambiente da próstata, o que pode diferir de outros trabalhos que avaliam biópsias ou células tumorais em cultura (CHEN; TOYOOKA; GAZDAR; HSIEH, 2003; DE MARZO; MEEKER; EPSTEIN; COFFEY, 1998; KRÖNIG; WALTER; DRENDEL; WERNER *et al.*, 2015). No entanto, esses genes fornecem informações iniciais no estudo da biologia de pericitos tumorais. Devido a sua plasticidade, e por estarem em um microambiente complexo e sujeito a modulações, pericitos que expressam esses genes devem ser estudados quanto ao seu potencial de se diferenciar em outras células, contribuindo assim para o crescimento do tumor.

A relevância de se avaliar a expressão gênica em neoplasias está diretamente relacionada ao seu valor prognóstico (MIZUNO; KITADA; NAKAI; SARAI, 2009). Em um estudo retrospectivo de 2011, Cuzick e colaboradores demonstraram a importância de genes relacionados ao controle do ciclo celular no prognóstico de pacientes com câncer de próstata (CUZICK; SWANSON; FISHER; BROTHMAN *et al.*, 2011). A expressão gênica também foi utilizada como ferramenta no prognóstico de câncer de cólon e de mama em outros estudos (MARISA; DE REYNIÈS; DUVAL; SELVES *et al.*, 2013; SJÖGREN; INGANÄS; NORBERG; LINDGREN *et al.*, 1996). Ao comparar os dados obtidos nesse trabalho com dados de sobrevida de pacientes com câncer de próstata não foi possível relacionar a maioria dos genes a um bom ou mau prognóstico. Pacientes com alta ou baixa expressão dos genes avaliados nesse trabalho não apresentavam diferença significativa na sobrevida em cinco anos.

Pericitos são capazes de sinalizar, de forma parácrina, para outras células do microambiente (ASADA; KUNISAKI; PIERCE; WANG *et al.*, 2017). Uma abordagem que pode ser utilizada futuramente é manipular os pericitos do microambiente tumoral como forma indireta de manipular o tumor e controlar seu crescimento. Terapias que neutralizam o marcador de pericitos NG2 demonstraram efeitos em reduzir a vasculatura de xenoinxertos tumorais (OZERDEM, 2006). Outro exemplo avaliado foi o gene *Socs3*, demonstrado estar aumentado em ambos os estágios de PIN nesse trabalho, já foi descrito em câncer de mama como uma forma de aumentar a sensibilidade do tumor à cisplatina (RU; STEELE; HSUEH; RAY, 2011). Compreender melhor a biologia dos pericitos no microambiente tumoral deverá facilitar a escolha de alvos mais eficazes e mais seguros para o tratamento de diferentes neoplasias.

## 9. Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que neoplasias intraepiteliais prostáticas (PINs) são geradas em animais C57 BL/6 a partir da superexpressão do oncogene *c-Myc* nas células epiteliais da próstata. Com o aumento do grau das lesões a expressão gênica dos pericitos do microambiente da próstata é alterada. Isso resulta em um aumento da expressão de genes supressores de tumor como *Gpx3*, *Gstp1*, *Rb1*, *Sfn* e *Sfrp1* bem como na diminuição de genes relacionados à progressão do câncer de próstata como *Ints6* e *Nfkb1*. Outros genes permaneceram com expressão elevada (*Ar*, *Cav2*, *Pten*, *Socs3* e *Trp53*) ou diminuída (*Dkk3* e *Dab2ip*) em ambos os graus das lesões avaliadas. Mecanismos de controle epigenéticos estão envolvidos na participação desses genes na progressão tumoral, sendo importante avaliar esse controle para compreender melhor o papel dos pericitos na progressão da lesão prostática. Os genes avaliados pelas metodologias utilizadas, não apresentam valor prognóstico, mas podem ser estudados como alvo para modulação gênica de pericitos com potencial na terapia do câncer de próstata.

## 10. Considerações finais e perspectivas

O câncer de próstata é uma neoplasia de extrema importância em todo o mundo pela sua prevalência, mortalidade e impacto na vida dos pacientes. Compreender o câncer como um microambiente complexo, sujeito a modulações e com diferentes células com potencial de mudar o prognóstico é essencial para a elaboração de novas alternativas terapêuticas. Um marco no

diagnóstico das lesões prostáticas é identificar neoplasias intraepiteliais de diferentes graus que podem evoluir para adenocarcinomas invasores. Estudar estágios iniciais do desenvolvimento tumoral possibilita identificar alterações discretas no microambiente que podem ser moduladas, de forma a aumentar ou diminuir sua influência na progressão da neoplasia.

Pericitos vêm sendo amplamente estudados em diferentes contextos e seu potencial em diferentes processos ainda não foi completamente descrito. Alguns modelos associados a metodologias de ponta permitem isolar essas células do microambiente como forma de estudá-las individualmente ou como uma população. Diferentes populações de pericitos podem ser moduladas geneticamente e utilizadas como ferramentas terapêuticas para neoplasias ou outros processos, e esse estudo fornece evidências iniciais de alvos que podem ser moldados para atingir esse objetivo.

Como perspectivas para que esse trabalho gere frutos para medicina translacional é necessário avaliar alguns pontos: 1) como os pericitos desse microambiente podem modular células imunes, 2) qual seu potencial de diferenciação *in vivo*, 3) quais genes podem ser silenciados ou superexpressos nessas células para que ela funcione como agente terapêutico. Dessa forma, além de compreender melhor a biologia de pericitos no microambiente tumoral será possível usá-lo como um agente terapêutico silencioso, ou um “cavalo de Troia” contra o câncer.

## 11. Referências

AALINKEEL, R.; NAIR, B.; CHEN, C. K.; MAHAJAN, S. D. *et al.* Nanotherapy silencing the interleukin-8 gene produces regression of prostate cancer by inhibition of angiogenesis. **Immunology**, 148, n. 4, p. 387-406, 2016.

ABATE-SHEN, C.; SHEN, M. M. Mouse models of prostate carcinogenesis. **Trends in genetics**, 18, n. 5, p. S1-S5, 2002.

ARMULIK, A.; GENOVÉ, G.; BETSHOLTZ, C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. **Developmental cell**, 21, n. 2, p. 193-215, 2011.

ASADA, N.; KUNISAKI, Y.; PIERCE, H.; WANG, Z. *et al.* Differential cytokine contributions of perivascular haematopoietic stem cell niches. **Nature cell biology**, 19, n. 3, p. 214, 2017.

AUMÜLLER, G.; LEONHARDT, M.; RENNEBERG, H.; VON RAHDEN, B. *et al.* Semiquantitative morphology of human prostatic development and regional distribution of prostatic neuroendocrine cells. **The Prostate**, 46, n. 2, p. 108-115, 2001.

BANDOPADHYAY, R.; ORTE, C.; LAWRENSON, J.; REID, A. *et al.* Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. **Journal of neurocytology**, 30, n. 1, p. 35-44, 2001.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nat Rev Cancer**, 3, n. 6, p. 401-410, Jun 2003.

BERGERS, G.; SONG, S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. **Neuro-oncology**, 7, n. 4, p. 452-464, 2005.

BIRBRAIR, A.; ZHANG, T.; FILES, D. C.; MANNAVA, S. *et al.* Type-1 pericytes accumulate after tissue injury and produce collagen in an organ-dependent manner. **Stem cell research & therapy**, 5, n. 6, p. 122, 2014.

BIRBRAIR, A.; ZHANG, T.; WANG, Z.-M.; MESSI, M. L. *et al.* Skeletal muscle neural progenitor cells exhibit properties of NG2-glia. **Experimental Cell Research**, 319, n. 1, p. 45-63, 2013/01/01/ 2013.

BIRBRAIR, A.; ZHANG, T.; WANG, Z.-M.; MESSI, M. L. *et al.* Skeletal muscle pericyte subtypes differ in their differentiation potential. **Stem cell research**, 10, n. 1, p. 67-84, 2013.

BIRBRAIR, A.; ZHANG, T.; WANG, Z.-M.; MESSI, M. L. *et al.* Pericytes: multitasking cells in the regeneration of injured, diseased, and aged skeletal muscle. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 6, n. 245, 2014-September-18 2014. Review.

BIRBRAIR, A.; ZHANG, T.; WANG, Z.-M.; MESSI, M. L. *et al.* Pericytes at the intersection between tissue regeneration and pathology. **Clinical science**, 128, n. 2, p. 81-93, 2015.

BIRBRAIR, A.; ZHANG, T.; WANG, Z.-M.; MESSI, M. L. *et al.* Type-2 pericytes participate in normal and tumoral angiogenesis. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 307, n. 1, p. C25-C38, 2014.

BONKHOFF, H.; REMBERGER, K. Widespread distribution of nuclear androgen receptors in the basal cell layer of the normal and hyperplastic human prostate. **Virchows Archiv A**, 422, n. 1, p. 35-38, 1993.

BONKHOFF, H.; REMBERGER, K. Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. **The Prostate**, 28, n. 2, p. 98-106, 1996.

BOSTWICK, D.; MONTIRONI, R.; SESTERHENN, I. A. Diagnosis of prostatic intraepithelial neoplasia: Prostate working group 1 consensus report. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, 34, n. 205, p. 3-10, 2000.

BOSTWICK, D. G.; BRAWER, M. K. Prostatic Intra-Epithelial Neoplasia and Early Invasion in Prostate Cancer. **Cancer**, 59, n. 4, p. 788-794, 1987.

BOSTWICK, D. G.; QIAN, J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Modern pathology**, 17, n. 3, p. 360, 2004.

BRETONES, G.; DELGADO, M. D.; LEÓN, J. Myc and cell cycle control. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, 1849, n. 5, p. 506-516, 2015.

CAMPBELL, S. C. ADVANCES IN ANGIOGENESIS RESEARCH: RELEVANCE TO UROLOGICAL ONCOLOGY. **The Journal of Urology**, 158, n. 5, p. 1663-1674, 1997/11/01/ 1997.

CHEN, H.; TOYOOKA, S.; GAZDAR, A. F.; HSIEH, J.-T. Epigenetic regulation of a novel tumor suppressor gene (hDAB2IP) in prostate cancer cell lines. **Journal of Biological Chemistry**, 278, n. 5, p. 3121-3130, 2003.

CHENG, Y.; GAO, X.-H.; LI, X.-J.; CAO, Q.-H. *et al.* Depression promotes prostate cancer invasion and metastasis via a sympathetic-cAMP-FAK signaling pathway. **Oncogene**, 37, n. 22, p. 2953, 2018.

CHENG, Y.; TANG, X.-Y.; LI, Y.-X.; ZHAO, D.-D. *et al.* Depression-induced neuropeptide Y secretion promotes prostate cancer growth by recruiting myeloid cells. **Clinical Cancer Research**, 25, n. 8, p. 2621-2632, 2019.

CORSELLI, M.; CHEN, C.-W.; CRISAN, M.; LAZZARI, L. *et al.* Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, 30, n. 6, p. 1104-1109, 2010.

CUNHA, G. R.; CHUNG, L. W.; SHANNON, J. M.; REESE, B. A. Stromal-epithelial interactions in sex differentiation. **Biology of reproduction**, 22, n. 1, p. 19-42, 1980.

CUNHA, G. R.; HAYWARD, S. W.; WANG, Y. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. **Differentiation**, 70, n. 9-10, p. 473-485, 2002.

CUNHA, G. R.; MATRISIAN, L. M. It's not my fault, blame it on my microenvironment. **Differentiation**, 70, n. 9-10, p. 469-472, 2002.

CUZICK, J.; SWANSON, G. P.; FISHER, G.; BROTHMAN, A. R. *et al.* Prognostic value of an RNA expression signature derived from cell cycle proliferation genes in patients with prostate cancer: a retrospective study. **The Lancet Oncology**, 12, n. 3, p. 245-255, 2011/03/01/ 2011.

DE MARZO, A. M.; MEEKER, A. K.; EPSTEIN, J. I.; COFFEY, D. S. Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. **The American journal of pathology**, 153, n. 3, p. 911-919, 1998.

DI CRISTOFANO, A.; DE ACETIS, M.; KOFF, A.; CORDON-CARDO, C. *et al.* Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. **Nature Genetics**, 27, n. 2, p. 222-224, 2001/02/01 2001.

DI SANT'AGNESE, P. A.; COCKETT, A. T. Neuroendocrine differentiation in prostatic malignancy. **Cancer**, 78, n. 2, p. 357-361, 1996.

EL-ALFY, M.; PELLETIER, G.; HERMO, L. S.; LABRIE, F. Unique features of the basal cells of human prostate epithelium. **Microscopy research and technique**, 51, n. 5, p. 436-446, 2000.

ELLIS, L.; KU, S.; LI, Q.; AZABDAFTARI, G. *et al.* Generation of a C57BL/6 MYC-Driven Mouse Model and Cell Line of Prostate Cancer. **The Prostate**, 76, n. 13, p. 1192-1202, 2016.

ELLWOOD-YEN, K.; GRAEBER, T. G.; WONGVIPAT, J.; IRUELA-ARISPE, M. L. *et al.* Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. **Cancer cell**, 4, n. 3, p. 223-238, 2003.

FARNSWORTH, W. E. Prostate stroma: physiology. **The prostate**, 38, n. 1, p. 60-72, 1999.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, 136, n. 5, p. E359-E386, 2015.

FOLKMAN, J.; WATSON, K.; INGBER, D.; HANAHAN, D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. **Nature**, 339, n. 6219, p. 58-61, 1989/05/01 1989.

FRANCK LISSBRANT, E. L., Jan-Erik Damber, Anders Bergh, Ingela. Blood vessels are regulators of growth, diagnostic markers and therapeutic targets in prostate cancer. **Scandinavian journal of urology and nephrology**, 35, n. 6, p. 437-452, 2001.

FRANKS, L. LATENCY AND PROGRESSION IN TUMOURS THE NATURAL HISTORY OF PROSTATIC CANCER. **The Lancet**, 268, n. 6951, p. 1037-1039, 1956.

FRANKS, L.; RIDDLE, P.; CARBONELL, A.; GEY, G. A comparative study of the ultrastructure and lack of growth capacity of adult human prostate epithelium mechanically separated from its stroma. **The Journal of pathology**, 100, n. 2, p. 113-119, 1970.

FRIDMAN, W. H.; PAGÈS, F.; SAUTÈS-FRIDMAN, C.; GALON, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nature Reviews Cancer**, 12, n. 4, p. 298, 2012.

GABAY, M.; LI, Y.; FELSHER, D. W. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, 4, n. 6, p. a014241, 2014.

GOGA, A.; YANG, D.; TWARD, A. D.; MORGAN, D. O. *et al.* Inhibition of CDK1 as a potential therapy for tumors over-expressing MYC. **Nature Medicine**, 13, n. 7, p. 820-827, 2007/07/01 2007.

GOLDMAN, M.; CRAFT, B.; HASTIE, M.; REPEČKA, K. *et al.* The UCSC Xena platform for public and private cancer genomics data visualization and interpretation. **bioRxiv**, p. 326470, 2019.

GONÇALVES, B. F.; DE CAMPOS, S. G. P.; ZANETONI, C.; SCARANO, W. R. *et al.* A New Proposed Rodent Model of Chemically Induced Prostate Carcinogenesis: Distinct Time-Course Prostate Cancer Progression in the Dorsolateral and Ventral Lobes. **The Prostate**, 73, n. 11, p. 1202-1213, 2013.

GRABOWSKA, M. M.; DEGRAFF, D. J.; YU, X.; JIN, R. J. *et al.* Mouse models of prostate cancer: picking the best model for the question. **Cancer and Metastasis Reviews**, 33, n. 2-3, p. 377-397, 2014.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer cell**, 21, n. 3, p. 309-322, 2012.



HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANOUN, M.; ARNAL-ESTAPÉ, A.; MARYANOVICH, M.; ZAHALKA, A. H. *et al.* Nestin+ NG2+ Cells Form a Reserve Stem Cell Population in the Mouse Prostate. **Stem cell reports**, 2019.

HAYWARD, S.; ROSEN, M.; CUNHA, G. Stromal–epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. **British journal of urology**, 79, n. S2, p. 18-26, 1997.

HENRIQUE, R.; JERÓNIMO, C.; HOQUE, M. O.; CARVALHO, A. L. *et al.* Frequent 14-3-3  $\sigma$  promoter methylation in benign and malignant prostate lesions. **DNA and cell biology**, 24, n. 4, p. 264-269, 2005.

HEUDORF, U.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; ANGERER, J. Phthalates: toxicology and exposure. **International journal of hygiene and environmental health**, 210, n. 5, p. 623-634, 2007.

HINZ, B.; GABBIANI, G. Fibrosis: recent advances in myofibroblast biology and new therapeutic perspectives. **F1000 biology reports**, 2, p. 78-78, 2010.

HIRSCHI, K. K.; D'AMORE, P. A. Pericytes in the microvasculature. **Cardiovasc Res**, 32, n. 4, p. 687-698, Oct 1996.

HUMPHREY, P. A. Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. **Histopathology**, 60, n. 1, p. 59-74, 2012.

IRSHAD, S.; ABATE-SHEN, C. Modeling prostate cancer in mice: something old, something new, something premalignant, something metastatic. **Cancer Metastasis Rev**, 32, n. 1-2, p. 109-122, Jun 2013.

ITTMANN, M.; HUANG, J.; RADAELLI, E.; MARTIN, P. *et al.* 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**, 73, n. 9, p. 2718-2736, 2013.

JENKINS, R. B.; QIAN, J.; LIEBER, M. M.; BOSTWICK, D. G. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. **Cancer research**, 57, n. 3, p. 524-531, 1997.

KAIGHN, M.; NARAYAN, K. S.; OHNUKI, Y.; LECHNER, J. *et al.* Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). **Investigative urology**, 17, n. 1, p. 16-23, 1979.

KALKAT, M.; DE MELO, J.; HICKMAN, K. A.; LOURENCO, C. *et al.* MYC deregulation in primary human cancers. **Genes**, 8, n. 6, p. 151, 2017.

KALKAT, M.; RESETCA, D.; LOURENCO, C.; CHAN, P.-K. *et al.* MYC protein interactome profiling reveals functionally distinct regions that cooperate to drive tumorigenesis. **Molecular cell**, 72, n. 5, p. 836-848. e837, 2018.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of clinical investigation**, 119, n. 6, p. 1420-1428, 2009.

KHAN, J. A.; MENDELSON, A.; KUNISAKI, Y.; BIRBRAIR, A. *et al.* Fetal liver hematopoietic stem cell niches associate with portal vessels. **Science**, 351, n. 6269, p. 176-180, 2016.

KLIONSKY, D. J.; ABDELMOHSEN, K.; ABE, A.; ABEDIN, M. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. **Autophagy**, 12, n. 1, p. 1-222, 2016.

KRÖNIG, M.; WALTER, M.; DRENDEL, V.; WERNER, M. *et al.* Cell type specific gene expression analysis of prostate needle biopsies resolves tumor tissue heterogeneity. **Oncotarget**, 6, n. 2, p. 1302, 2015.

KUMAR, V.; PATEL, S.; TCGANOV, E.; GABRILOVICH, D. I. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. **Trends Immunol**, 37, n. 3, p. 208-220, Mar 2016.

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. **Nature reviews Molecular cell biology**, 15, n. 3, p. 178, 2014.

LEITZMANN, M. F.; ROHRMANN, S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. **Clinical Epidemiology**, 4, p. 1-11, 01/05 2012.

LEMOS, D. R.; MARSH, G.; HUANG, A.; CAMPANHOLLE, G. *et al.* Maintenance of vascular integrity by pericytes is essential for normal kidney function. **American journal of physiology. Renal physiology**, 311, n. 6, p. F1230-F1242, 2016.

LIN, D.; WYATT, A. W.; XUE, H.; WANG, Y. *et al.* High Fidelity Patient-Derived Xenografts for Accelerating Prostate Cancer Discovery and Drug Development. **Cancer Research**, 74, n. 4, p. 1272-1283, 2014.

LIN, S.-C.; LEE, Y.-C.; YU, G.; CHENG, C.-J. *et al.* Endothelial-to-Osteoblast Conversion Generates Osteoblastic Metastasis of Prostate Cancer. **Developmental cell**, 41, n. 5, p. 467-480. e463, 2017.

LINDAHL, P.; JOHANSSON, B. R.; LEVEEN, P.; BETSHOLTZ, C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. **Science**, 277, n. 5323, p. 242-245, 1997.

LV, F.-J.; TUAN, R. S.; CHEUNG, K.; LEUNG, V. Y. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. **Stem cells**, 32, n. 6, p. 1408-1419, 2014.

MAGNON, C.; HALL, S. J.; LIN, J.; XUE, X. *et al.* Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. **Science**, 341, n. 6142, p. 1236361, 2013.

MARISA, L.; DE REYNIÈS, A.; DUVAL, A.; SELVES, J. *et al.* Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. **PLOS Medicine**, 10, n. 5, p. e1001453, 2013.

MASTERS, J. R. Human cancer cell lines: fact and fantasy. **Nature reviews Molecular cell biology**, 1, n. 3, p. 233, 2000.

MAUFFREY, P.; TCHITCHEK, N.; BARROCA, V.; BEMELMANS, A. *et al.* Progenitors from the central nervous system drive neurogenesis in cancer. **Nature**, 569, n. 7758, p. 672, 2019.

MCNEAL, J. The anatomic heterogeneity of the prostate. **Progress in clinical and biological research**, 37, p. 149, 1980.

MCNEAL, J. E. Regional Morphology and Pathology of The Prostate. **American Journal of Clinical Pathology**, 49, n. 3, p. 347-357, 1968.

MCNEAL, J. E. Anatomy of the prostate: an historical survey of divergent views. **The prostate**, 1, n. 1, p. 3-13, 1980.

MCNEAL, J. E. The zonal anatomy of the prostate. **The prostate**, 2, n. 1, p. 35-49, 1981.

MCNEAL, J. E. Normal histology of the prostate. **The American journal of surgical pathology**, 12, n. 8, p. 619-633, 1988.

MCNEAL, J. E.; REDWINE, E. A.; FREIHA, F. S.; STAMEY, T. A. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. **The American journal of surgical pathology**, 12, n. 12, p. 897-906, 1988.

MEYER, N.; PENN, L. Z. Reflecting on 25 years with MYC. **Nature Reviews Cancer**, 8, n. 12, p. 976-990, 2008/12/01 2008.

MIAO, Y.; YANG, H.; LEVORSE, J.; YUAN, S. *et al.* Adaptive Immune Resistance Emerges from Tumor-Initiating Stem Cells. **Cell**, 177, n. 5, p. 1172-1186.e1114, May 16 2019.

MIZUNO, H.; KITADA, K.; NAKAI, K.; SARAI, A. PrognoScan: a new database for meta-analysis of the prognostic value of genes. **BMC Medical Genomics**, 2, n. 1, p. 18, 2009/04/24 2009.

MORIKAWA, S.; BALUK, P.; KAIDOH, T.; HASKELL, A. *et al.* Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. **Am J Pathol**, 160, n. 3, p. 985-1000, Mar 2002.

MORITA, Z.; CHANG, M. An adverse effect of the ventral prostate secretion on hamster epididymal spermatozoa. **Journal of reproduction and fertility**, 24, n. 2, p. 255-260, 1971.

MURGAI, M.; JU, W.; EASON, M.; KLINE, J. *et al.* KLF4-dependent perivascular cell plasticity mediates pre-metastatic niche formation and metastasis. **Nature Medicine**, 23, n. 10, p. 1176-1190, 2017/10/01 2017.

NAG, A. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. **Cytobios**, 28, n. 109, p. 41-61, 1980.

NAVONE, N. M.; OLIVE, M.; OZEN, M.; DAVIS, R. *et al.* Establishment of two human prostate cancer cell lines derived from a single bone metastasis. **Clinical Cancer Research**, 3, n. 12, p. 2493-2500, 1997.

NIESCHLAG, E.; BEHRE, H. M.; NIESCHLAG, S.; VAN AHLEN, H. Andrology. Male reproductive health and dysfunction. **Internistische Praxis**, 51, n. 4, p. 751, 2011.

O'DONNELL, J. S.; TENG, M. W. L.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, 16, n. 3, p. 151-167, 2019/03/01 2019.

OZAWA, M. G.; YAO, V. J.; CHANTHERY, Y. H.; TRONCOSO, P. *et al.* Angiogenesis with pericyte abnormalities in a transgenic model of prostate carcinoma. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, 104, n. 10, p. 2104-2115, 2005.

OZERDEM, U. Targeting of pericytes diminishes neovascularization and lymphangiogenesis in prostate cancer. **The Prostate**, 66, n. 3, p. 294-304, 2006.

OZERDEM, U.; GRAKO, K. A.; DAHLIN-HUPPE, K.; MONOSOV, E. *et al.* NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. **Dev Dyn**, 222, n. 2, p. 218-227, Oct 2001.

PARK, J.-H.; WALLS, J. E.; GALVEZ, J. J.; KIM, M. *et al.* Prostatic intraepithelial neoplasia in genetically engineered mice. **The American journal of pathology**, 161, n. 2, p. 727-735, 2002.

PARK, S. L.; BUZZAI, A.; RAUTELA, J.; HOR, J. L. *et al.* Tissue-resident memory CD8<sup>+</sup> T cells promote melanoma-immune equilibrium in skin. **Nature**, 565, n. 7739, p. 366, 2019.

PEIXOTO, A. R.; SANTOS, T. M.; BRANDT, J. Z.; DELELLA, F. K. *et al.* Gestational and lactational exposition to Di-N-butyl-phthalate (DBP) increases inflammation and preneoplastic lesions in prostate of wistar rats after carcinogenic N-methyl-N-nitrosourea (MNU) plus testosterone protocol. **Environmental toxicology**, 31, n. 10, p. 1185-1195, 2016.

PIENTA, K. J.; ESPER, P. S. Risk factors for prostate cancer. **Annals of internal medicine**, 118, n. 10, p. 793-803, 1993.

PIERCONTI, F.; MARTINI, M.; PINTO, F.; CENCI, T. *et al.* Epigenetic silencing of SOCS3 identifies a subset of prostate cancer with an aggressive behavior. **The Prostate**, 71, n. 3, p. 318-325, 2011.

PRENDERGAST, G. C. Mechanisms of apoptosis by c-Myc. **Oncogene**, 18, n. 19, p. 2967, 1999.

PRENSNER, J. R.; RUBIN, M. A.; WEI, J. T.; CHINNAIYAN, A. M. Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. **Science translational medicine**, 4, n. 127, p. 127rv123-127rv123, 2012.

QIAN, J.; JENKINS, R. B.; BOSTWICK, D. G. Detection of chromosomal anomalies and c-myc gene amplification in the cribriform pattern of prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma by fluorescence in situ hybridization. **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, 10, n. 11, p. 1113-1119, 1997.

RATNACARAM, C. K.; TELETIN, M.; JIANG, M.; MENG, X. *et al.* Temporally controlled ablation of PTEN in adult mouse prostate epithelium generates a model of invasive prostatic adenocarcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105, n. 7, p. 2521-2526, 2008.

RAZA, A.; FRANKLIN, M. J.; DUDEK, A. Z. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. **American journal of hematology**, 85, n. 8, p. 593-598, 2010.

REEVES, M. Q.; KANDYBA, E.; HARRIS, S.; DEL ROSARIO, R. *et al.* Multicolour lineage tracing reveals clonal dynamics of squamous carcinoma evolution from initiation to metastasis. **Nature cell biology**, 20, n. 6, p. 699, 2018.

REYES, A. O.; SWANSON, P. E.; CARBONE, J. M.; HUMPHREY, P. A. Unusual histologic types of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **The American journal of surgical pathology**, 21, n. 10, p. 1215-1222, 1997.

RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E. "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. **Developmental biology**, 372, n. 2, p. 157-165, 2012.

RIBATTI, D.; NICO, B.; CRIVELLATO, E. The role of pericytes in angiogenesis. **International Journal of Developmental Biology**, 55, n. 3, p. 261-268, 2011.

RISBRIDGER, G. P.; TAYLOR, R. A. Physiology of the male accessory sex structures: the prostate gland, seminal vesicles, and bulbourethral glands. *In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)*: Elsevier, 2006. p. 1149-1172.

ROUGET, C. Mémoire sur le développement, la structure et les propriétés physiologiques des capillaires sanguins et lymphatiques. *Arch. Physiol. norm, et Path.* 5, 603–663 (1873).-Roux, W.:(a) Gesammelte Abhandlungen über Entwicklungsmechanik. Leipzig 1895.(b) Theorie der Gestaltung der Blutgefäße einschl. des Kollateralkreislaufes. **A. Oppel: Über die gestaltliche Anpassung der Blutgefäße usw. Leipzig**, 1910.

RU, P.; STEELE, R.; HSUEH, E. C.; RAY, R. B. Anti-miR-203 upregulates SOCS3 expression in breast cancer cells and enhances cisplatin chemosensitivity. **Genes & cancer**, 2, n. 7, p. 720-727, 2011.

SAÚDE, M. d. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. : INCA RJ 2017.

SCHER, H. I.; HALABI, S.; TANNOCK, I.; MORRIS, M. *et al.* Design and End Points of Clinical Trials for Patients With Progressive Prostate Cancer and Castrate Levels of Testosterone: Recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, 26, n. 7, p. 1148-1159, 2008.

SHENOY, A. K.; JIN, Y.; LUO, H.; TANG, M. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition confers pericyte properties on cancer cells. **The Journal of clinical investigation**, 126, n. 11, p. 4174-4186, 2016.

SILVA, W. N.; LEONEL, C.; PRAZERES, P. H. D. M.; SENA, I. F. G. *et al.* Role of Schwann cells in cutaneous wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, 26, n. 5, p. 392-397, 2018.

SINGAL, R.; FERDINAND, L.; REIS, I. M.; SCHLESSELMAN, J. J. Methylation of multiple genes in prostate cancer and the relationship with clinicopathological features of disease. **Oncology reports**, 12, n. 3, p. 631-637, 2004.

SJÖGREN, S.; INGANÄS, M.; NORBERG, T.; LINDGREN, A. *et al.* The p53 Gene in Breast Cancer: Prognostic Value of Complementary DNA Sequencing Versus Immunohistochemistry. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, 88, n. 3-4, p. 173-182, 1996.

SONG, J. Z.; STIRZAKER, C.; HARRISON, J.; MELKI, J. R. *et al.* Hypermethylation trigger of the glutathione-S-transferase gene (GSTP1) in prostate cancer cells. **Oncogene**, 21, n. 7, p. 1048, 2002.

STEWART, B.; WILD, C. P. World cancer report 2014. 2014.

STEWART, B.; WILD, C. P. World cancer report 2014. **Health**, 2017.

SUN, S.; SPRENGER, C. C.; VESSELLA, R. L.; HAUGK, K. *et al.* Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. **The Journal of clinical investigation**, 120, n. 8, p. 2715-2730, 2010.

SZADVARI, I.; KRIZANOVA, O.; BABULA, P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. **Physiological research**, 65, 2016.

THACKARE, H.; NICHOLSON, H. D.; WHITTINGTON, K. Oxytocin—its role in male reproduction and new potential therapeutic uses. **Human reproduction update**, 12, n. 4, p. 437-448, 2006.

THIERY, J. P.; ACLOQUE, H.; HUANG, R. Y.; NIETO, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. **cell**, 139, n. 5, p. 871-890, 2009.

TUXHORN, J. A.; AYALA, G. E.; ROWLEY, D. R. Reactive stroma in prostate cancer progression. **The Journal of urology**, 166, n. 6, p. 2472-2483, 2001.

VARELA, H.; DÍAZ-FLORES, L.; MARTÍN-VASALLO, P.; GUTIÉRREZ, R. *et al.* Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. **Histology and histopathology**, 2009.

VEECK, J.; WILD, P. J.; FUCHS, T.; SCHÜFFLER, P. J. *et al.* Prognostic relevance of Wnt-inhibitory factor-1 (WIF1) and Dickkopf-3 (DKK3) promoter methylation in human breast cancer. **BMC Cancer**, 9, n. 1, p. 217, 2009/07/01 2009.

VON TELL, D.; ARMULIK, A.; BETSHOLTZ, C. Pericytes and vascular stability. **Experimental Cell Research**, 312, n. 5, p. 623-629, 2006/03/10/ 2006.

WELÉN, K.; JENNBACKEN, K.; TEŠAN, T.; DAMBER, J. E. Pericyte coverage decreases invasion of tumour cells into blood vessels in prostate cancer xenografts. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, 12, n. 1, p. 41-46, 2009/03/01 2009.

WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, 27, p. 5904, 10/06/online 2008. Review.

WILHELM, P.; RITTER, U.; LABBOW, S.; DONHAUSER, N. *et al.* Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. **The Journal of Immunology**, 166, n. 6, p. 4012-4019, 2001.

WILSON, J. D. Role of dihydrotestosterone in androgen action. **The Prostate**, 29, n. S6, p. 88-92, 1996.

WINKLER, E. A.; BELL, R. D.; ZLOKOVIC, B. V. Pericyte-specific expression of PDGF beta receptor in mouse models with normal and deficient PDGF beta receptor signaling. **Molecular Neurodegeneration**, 5, n. 1, p. 32, 2010/08/25 2010.

WRIGHT, A. S.; THOMAS, L. N.; DOUGLAS, R. C.; LAZIER, C. B. *et al.* Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of the castrated rat. **The Journal of clinical investigation**, 98, n. 11, p. 2558-2563, 1996.

WYNDER, E. L.; MABUCHI, K.; WHITMORE, W. F. Epidemiology of cancer of the prostate. **Cancer**, 28, n. 2, p. 344-360, 1971.

YAMAZAKI, T.; NALBANDIAN, A.; UCHIDA, Y.; LI, W. *et al.* Tissue myeloid progenitors differentiate into pericytes through TGF- $\beta$  signaling in developing skin vasculature. **Cell reports**, 18, n. 12, p. 2991-3004, 2017.

YAN, P. Y.; YU, G.; TSENG, G.; CIEPLY, K. *et al.* Glutathione peroxidase 3, deleted or methylated in prostate cancer, suppresses prostate cancer growth and metastasis. **Cancer research**, 67, n. 17, p. 8043-8050, 2007.

ZHALKA, A. H.; ARNAL-ESTAPÉ, A.; MARYANOVICH, M.; NAKAHARA, F. *et al.* Adrenergic nerves activate an angio-metabolic switch in prostate cancer. **Science**, 358, n. 6361, p. 321-326, 2017.

ZHALKA, A. H.; ARNAL-ESTAPE, A.; MARYANOVICH, M.; NAKAHARA, F. *et al.* Adrenergic nerves activate an angio-metabolic switch in prostate cancer. **Science**, 358, n. 6361, p. 321-326, Oct 20 2017.

ZHOU, Z.; FLESKEN-NIKITIN, A.; CORNEY, D. C.; WANG, W. *et al.* Synergy of p53 and Rb deficiency in a conditional mouse model for metastatic prostate cancer. **Cancer research**, 66, n. 16, p. 7889-7898, 2006.



ZHU, X.; BERGLES, D. E.; NISHIYAMA, A. NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. **Development**, 135, n. 1, p. 145-157, 2008.

ZIMMERMANN, K. W. Der feinere bau der blutcapillaren. **Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte**, 68, n. 1, p. 29-109, 1923.

## 12. Anexos

### Anexo I – Aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**UFMG**

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 187/2017  
**Título do projeto:** Comparação entre pericitos derivados de próstata normal ou de tumor de prostata.  
**Finalidade:** Pesquisa  
**Pesquisador responsável:** Alexander Birbrair  
**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas  
**Departamento:** Departamento de Patologia

**Situação atual:** **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião do dia 02/10/2017. Validade: 02/10/2017 à 01/10/2022

Belo Horizonte, 02/10/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de [Minas Gerais](#)  
[Avenida Antônio Carlos, 6627](#) - Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

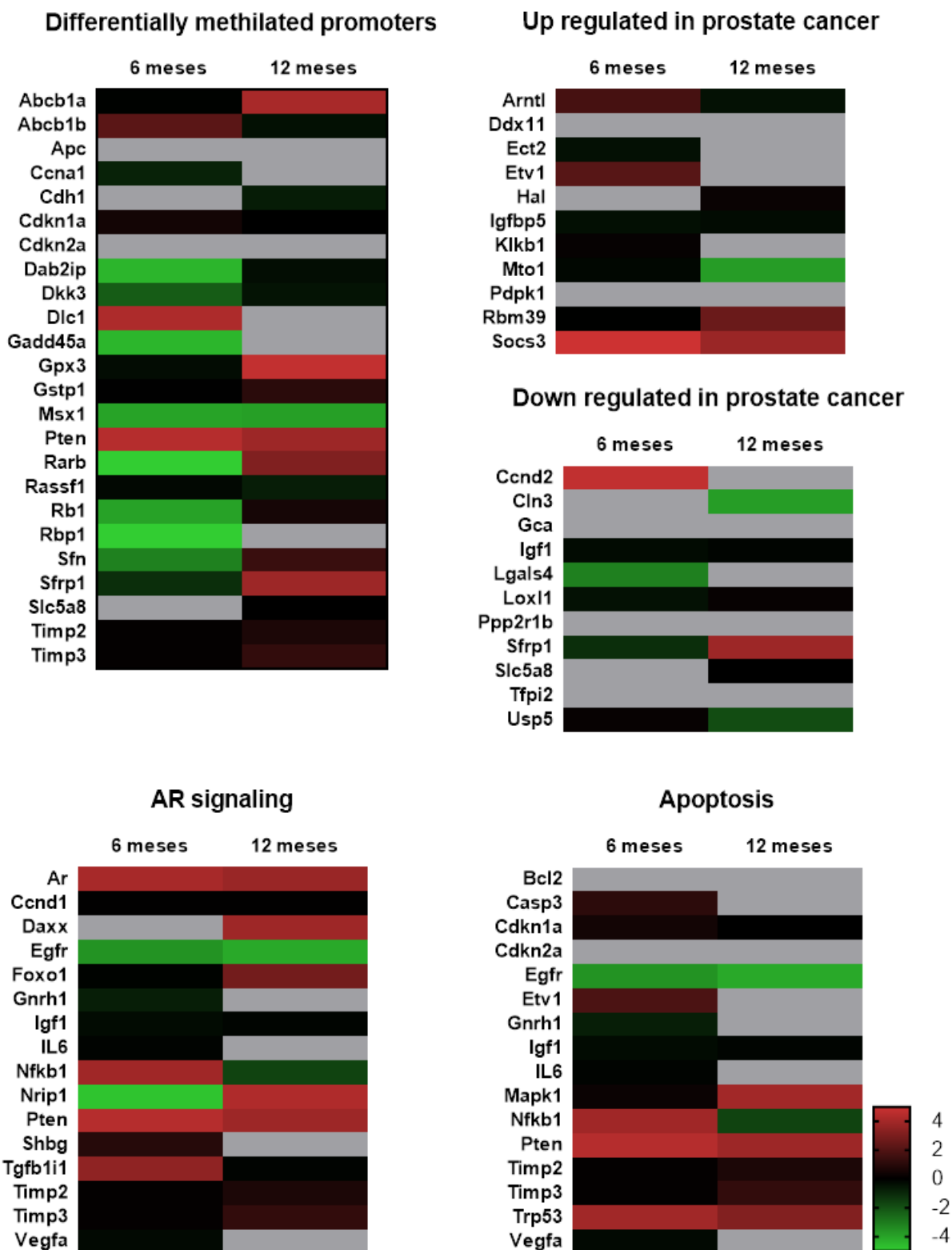
## Anexo II – Genes analisados por qPCR (Qiagen – PAMM-135ZR Cat. no. 330231)

**Gene table: RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array**

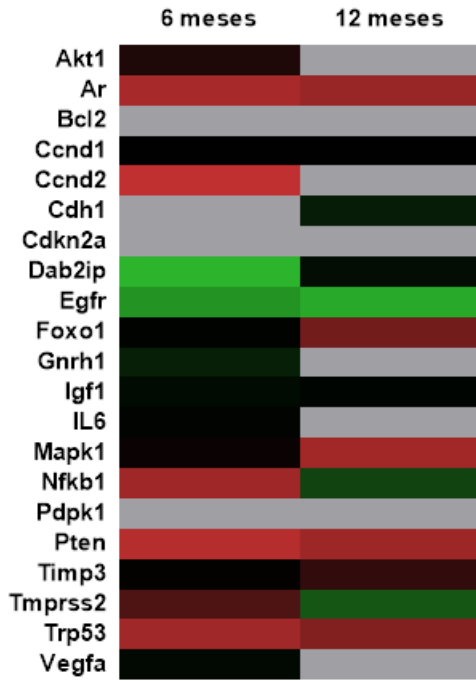
| Position | UniGene   | GenBank      | Symbol  | Description   |
|----------|-----------|--------------|---------|---|
| A01      | Mm.207354 | NM_011076    | Abcb1a  | ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A   |
| A02      | Mm.146649 | NM_011075    | Abcb1b  | ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B   |
| A03      | Mm.31374  | NM_133360    | Acaca   | Acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha   |
| A04      | Mm.6645   | NM_009652    | Akt1    | Thymoma viral proto-oncogene 1  |
| A05      | Mm.384171 | NM_007462    | Apc     | Adenomatosis polyposis coli   |
| A06      | Mm.39005  | NM_013476    | Ar      | Androgen receptor   |
| A07      | Mm.440371 | NM_007489    | Arntl   | Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like   |
| A08      | Mm.257460 | NM_009741    | Bcl2    | B-cell leukemia/lymphoma 2  |
| A09      | Mm.9998   | NM_018883    | Camkk1  | Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha   |
| A10      | Mm.34405  | NM_009810    | Casp3   | Caspase 3   |
| A11      | Mm.396075 | NM_016900    | Cav2    | Caveolin 2  |
| A12      | Mm.4815   | NM_007628    | Ccna1   | Cyclin A1   |
| B01      | Mm.273049 | NM_007631    | Ccnd1   | Cyclin D1   |
| B02      | Mm.333406 | NM_009829    | Ccnd2   | Cyclin D2   |
| B03      | Mm.35605  | NM_009864    | Cdh1    | Cadherin 1  |
| B04      | Mm.195663 | NM_007669    | Cdkn1a  | Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)  |
| B05      | Mm.4733   | NM_009877    | Cdkn2a  | Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A  |
| B06      | Mm.268930 | NM_009907    | Cln3    | Ceroid lipofuscinosis, neuronal 3, juvenile (Batten, Spielmeyer-Vogt disease)                       |
| B07      | Mm.453295 | NM_133828    | Creb1   | CAMP responsive element binding protein 1   |
| B08      | Mm.29629  | NM_001001602 | Dab2ip  | Disabled homolog 2 (Drosophila) interacting protein   |
| B09      | Mm.271809 | NM_007829    | Daxx    | Fas death domain-associated protein   |
| B10      | Mm.259605 | NM_001003919 | Ddx11   | DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 11 (CHL1-like helicase homolog, <i>S. cerevisiae</i> ) |
| B11      | Mm.55143  | NM_015814    | Dkk3    | Dickkopf homolog 3 ( <i>Xenopus laevis</i> )  |
| B12      | Mm.210875 | NM_015802    | Dlc1    | Deleted in liver cancer 1   |
| C01      | Mm.261453 | NM_007900    | Ect2    | Ect2 oncogene   |
| C02      | Mm.8534   | NM_007912    | Egfr    | Epidermal growth factor receptor  |
| C03      | Mm.103737 | NM_018781    | Egr3    | Early growth response 3   |
| C04      | Mm.164531 | NM_133659    | Erg     | Avian erythroblastosis virus E-26 (v-ets) oncogene related  |
| C05      | Mm.4866   | NM_007960    | Etv1    | Ets variant gene 1  |
| C06      | Mm.236443 | NM_007988    | Fasn    | Fatty acid synthase   |
| C07      | Mm.29891  | NM_019739    | Foxo1   | Forkhead box O1   |
| C08      | Mm.72235  | NM_007836    | Gadd45a | Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha   |
| C09      | Mm.219877 | NM_145523    | Gca     | Grancalcin  |
| C10      | Mm.358309 | NM_008145    | Gnrh1   | Gonadotropin releasing hormone 1  |
| C11      | Mm.200916 | NM_008161    | Gpx3    | Glutathione peroxidase 3  |
| C12      | Mm.299292 | NM_013541    | Gstp1   | Glutathione S-transferase, pi 1   |
| D01      | Mm.13000  | NM_010401    | Hal     | Histidine ammonia lyase   |
| D02      | Mm.485394 | NM_008255    | Hmgcr   | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase   |
| D03      | Mm.268521 | NM_010512    | Igf1    | Insulin-like growth factor 1  |
| D04      | Mm.405761 | NM_010518    | Igfbp5  | Insulin-like growth factor binding protein 5  |
| D05      | Mm.1019   | NM_031168    | Il6     | Interleukin 6   |
| D06      | Mm.319684 | NM_008715    | Ints6   | Integrator complex subunit 6  |
| D07      | Mm.224306 | NM_026167    | Khlh13  | Kelch-like 13 ( <i>Drosophila</i> )   |
| D08      | Mm.482691 | NM_008455    | Klkb1   | Kallikrein B, plasma 1  |

| Position | UniGene   | GenBank      | Symbol   | Description   |
|----------|-----------|--------------|----------|---|
| D09      | Mm.210336 | NM_010706    | Lgals4   | Lectin, galactose binding, soluble 4  |
| D10      | Mm.250492 | NM_010729    | Loxl1    | Lysyl oxidase-like 1  |
| D11      | Mm.196581 | NM_011949    | Mapk1    | Mitogen-activated protein kinase 1  |
| D12      | Mm.268548 | NM_008558    | Max      | Max protein   |
| E01      | Mm.256509 | NM_010835    | Msx1     | Homeobox, msh-like 1  |
| E02      | Mm.291779 | NM_026658    | Mto1     | Mitochondrial translation optimization 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )       |
| E03      | Mm.279256 | NM_013865    | Ndrp3    | N-myc downstream regulated gene 3   |
| E04      | Mm.256765 | NM_008689    | Nfkb1    | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105      |
| E05      | Mm.3520   | NM_010921    | Nkx3-1   | NK-3 transcription factor, locus 1 ( <i>Drosophila</i> )                        |
| E06      | Mm.74711  | NM_173440    | Nrip1    | Nuclear receptor interacting protein 1  |
| E07      | Mm.10504  | NM_011062    | Pdpk1    | 3-phosphoinositide dependent protein kinase 1                                   |
| E08      | Mm.28659  | NM_022889    | Pes1     | Pescadillo homolog 1, containing BRCT domain (zebrafish)                        |
| E09      | Mm.7726   | NM_001034085 | Ppp2r1b  | Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), beta isoform |
| E10      | Mm.458152 | NM_031869    | Prkab1   | Protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit                     |
| E11      | Mm.245395 | NM_008960    | Pten     | Phosphatase and tensin homolog  |
| E12      | Mm.275434 | NM_008969    | Ptgs1    | Prostaglandin-endoperoxide synthase 1   |
| F01      | Mm.259318 | NM_011243    | Rarb     | Retinoic acid receptor, beta  |
| F02      | Mm.12091  | NM_019713    | Rassf1   | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1                            |
| F03      | Mm.273862 | NM_009029    | Rb1      | Retinoblastoma 1  |
| F04      | Mm.392436 | NM_133242    | Rbm39    | RNA binding motif protein 39  |
| F05      | Mm.279741 | NM_011254    | Rbp1     | Retinol binding protein 1, cellular   |
| F06      | Mm.324474 | NM_028148    | Scaf11   | SR-related CTD-associated factor 11   |
| F07      | Mm.270259 | NM_009859    | Sept7    | Septin 7  |
| F08      | Mm.44482  | NM_018754    | Sfn      | Stratifin   |
| F09      | Mm.281691 | NM_013834    | Sfrp1    | Secreted frizzled-related protein 1   |
| F10      | Mm.1431   | NM_011367    | Shbg     | Sex hormone binding globulin  |
| F11      | Mm.77381  | NM_145423    | Slc5a8   | Solute carrier family 5 (iodide transporter), member 8                          |
| F12      | Mm.3468   | NM_007707    | Socs3    | Suppressor of cytokine signaling 3  |
| G01      | Mm.240627 | NM_009238    | Sox4     | SRY-box containing gene 4   |
| G02      | Mm.278701 | NM_011480    | Sreb1    | Sterol regulatory element binding transcription factor 1                        |
| G03      | Mm.44231  | NM_011492    | Stk11    | Serine/threonine kinase 11  |
| G04      | Mm.164187 | NM_028150    | Supt7l   | Suppressor of Ty 7 ( <i>S. cerevisiae</i> )-like                                |
| G05      | Mm.25612  | NM_009364    | Tfpi2    | Tissue factor pathway inhibitor 2   |
| G06      | Mm.3248   | NM_009365    | Tgfb1i1  | Transforming growth factor beta 1 induced transcript 1                          |
| G07      | Mm.206505 | NM_011594    | Timp2    | Tissue inhibitor of metalloproteinase 2   |
| G08      | Mm.4871   | NM_011595    | Timp3    | Tissue inhibitor of metalloproteinase 3   |
| G09      | Mm.276145 | NM_015775    | Tmprss2  | Transmembrane protease, serine 2  |
| G10      | Mm.222    | NM_011640    | Trp53    | Transformation related protein 53   |
| G11      | Mm.3571   | NM_013700    | Usp5     | Ubiquitin specific peptidase 5 (isopeptidase T)                                 |
| G12      | Mm.282184 | NM_009505    | Vegfa    | Vascular endothelial growth factor A  |
| H01      | Mm.328431 | NM_007393    | Actb     | Actin, beta   |
| H02      | Mm.163    | NM_009735    | B2m      | Beta-2 microglobulin  |
| H03      | Mm.343110 | NM_008084    | Gapdh    | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  |
| H04      | Mm.3317   | NM_010368    | Gusb     | Glucuronidase, beta   |
| H05      | Mm.2180   | NM_008302    | Hsp90ab1 | Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1                       |
| H06      | N/A       | SA_00106     | MGDC     | Mouse Genomic DNA Contamination   |
| H07      | N/A       | SA_00104     | RTC      | Reverse Transcription Control   |
| H08      | N/A       | SA_00104     | RTC      | Reverse Transcription Control   |
| H09      | N/A       | SA_00104     | RTC      | Reverse Transcription Control   |
| H10      | N/A       | SA_00103     | PPC      | Positive PCR Control  |
| H11      | N/A       | SA_00103     | PPC      | Positive PCR Control  |
| H12      | N/A       | SA_00103     | PPC      | Positive PCR Control  |

## Anexo III – Genes e vias analisadas



### AKT/PI3K signaling



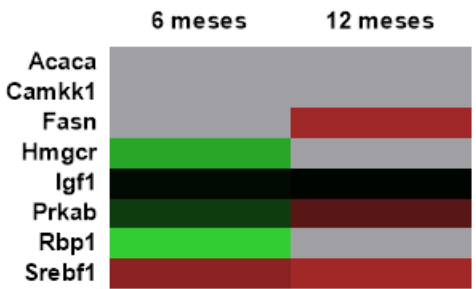
### Cell cycle regulators



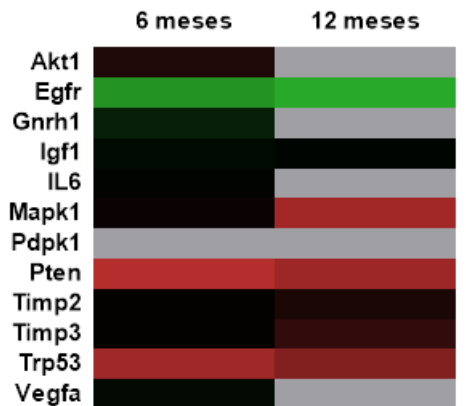
### Other prostate cancer related genes



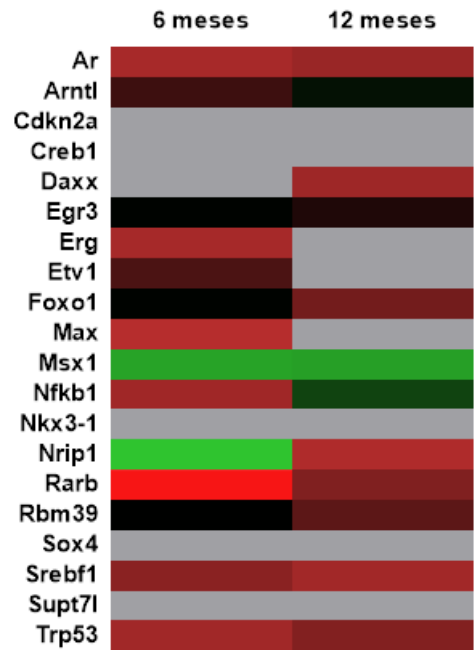
### Fatty acid metabolism



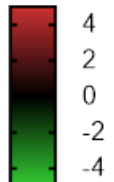
### PTEN signaling



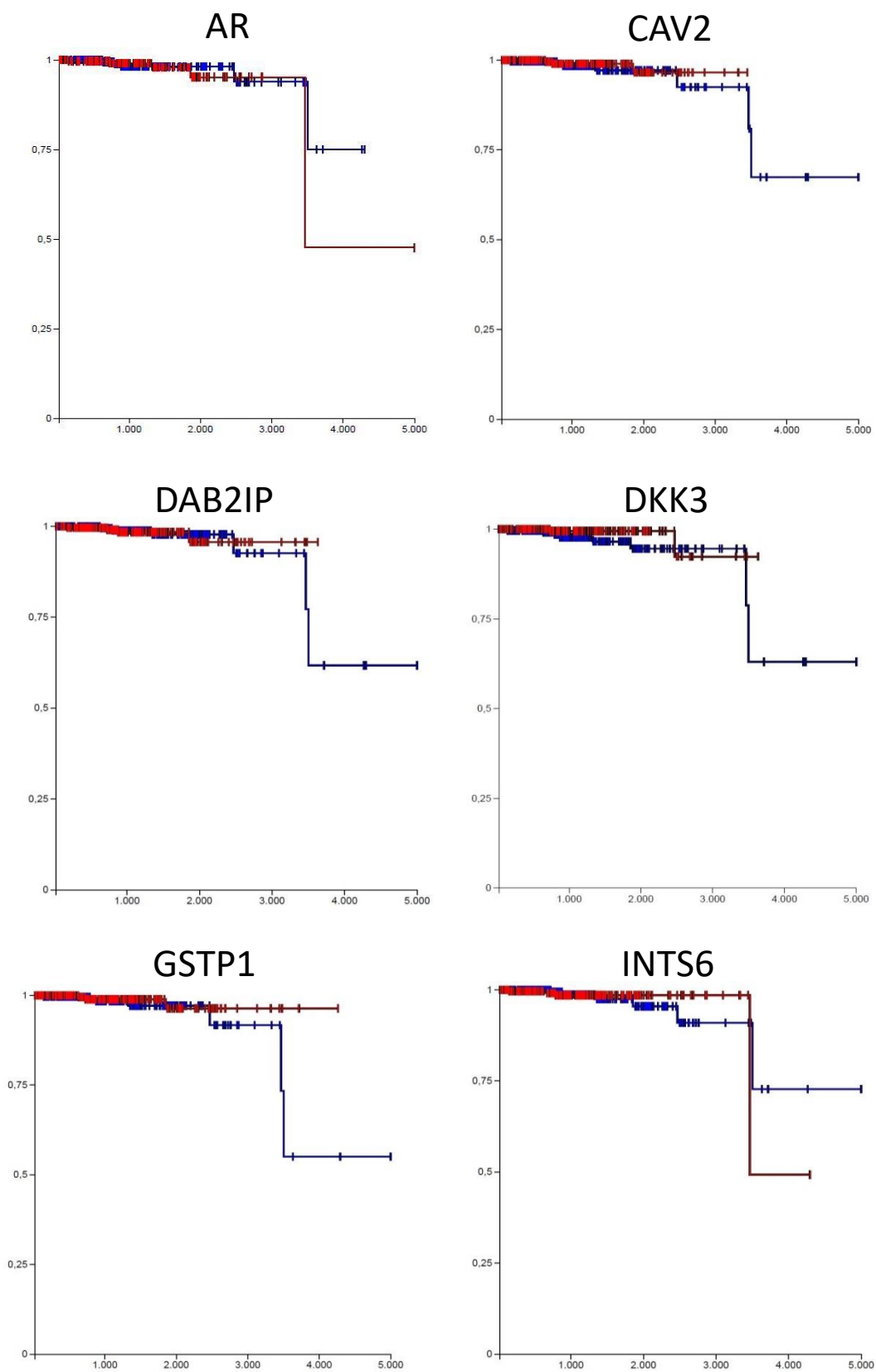
### Transcription factors



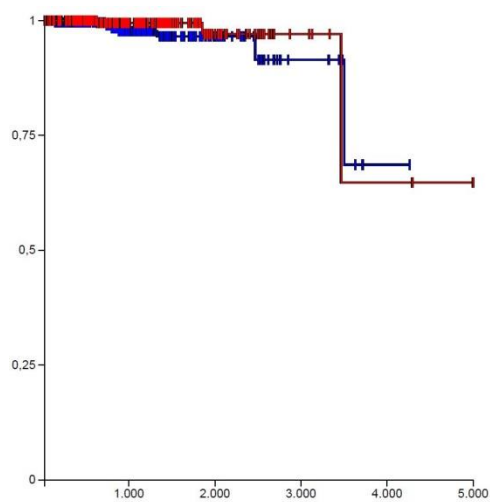
### Metastatic potential



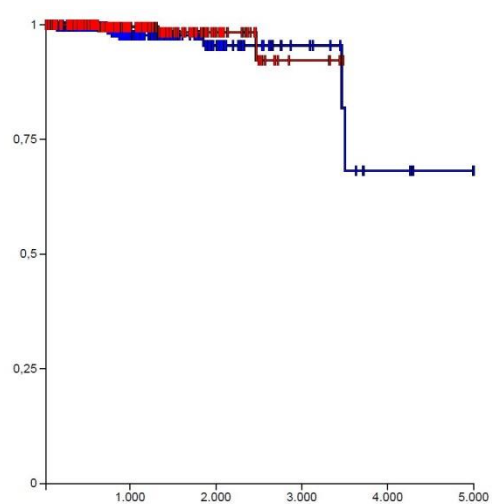
## Anexo IV – Curvas de sobrevida



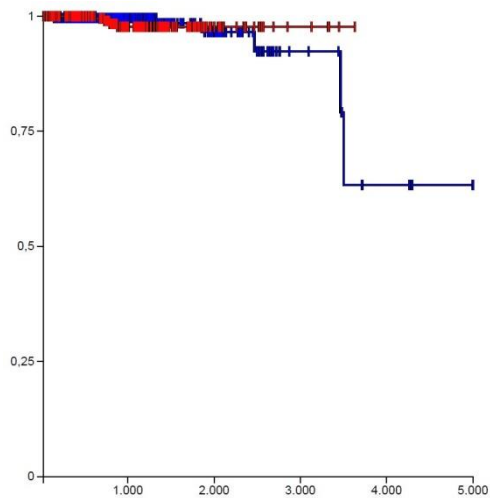
NFKB1



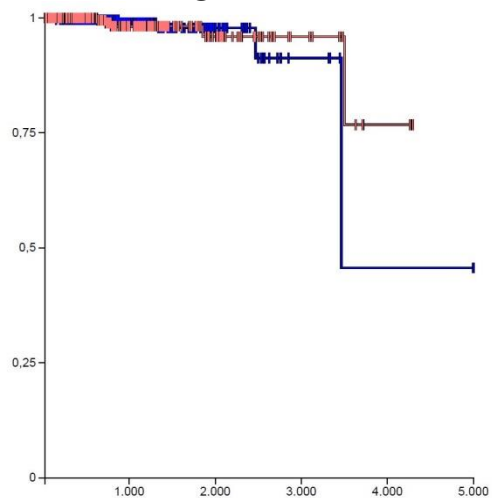
PTEN



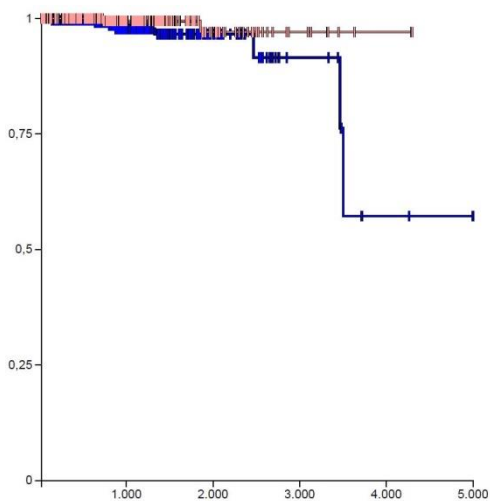
RB1



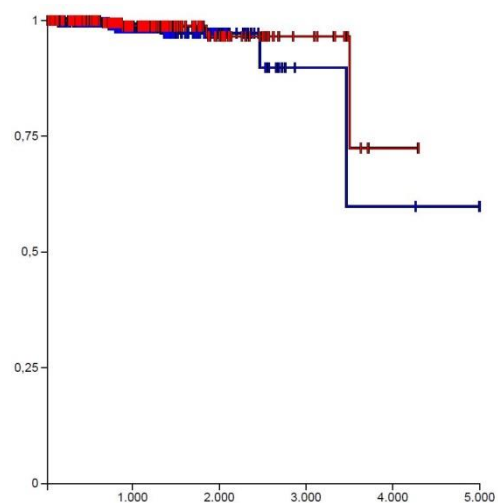
SFN



SFRP1

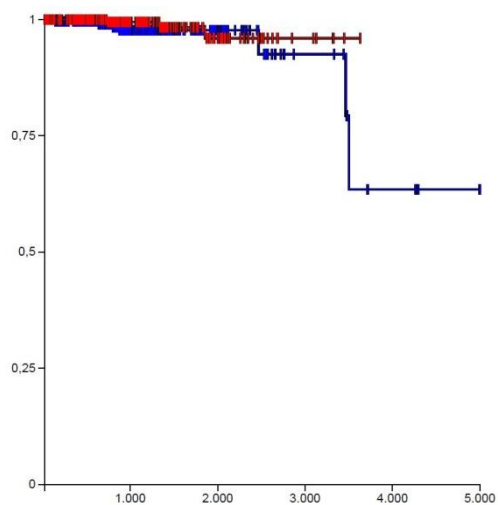


SOCS3

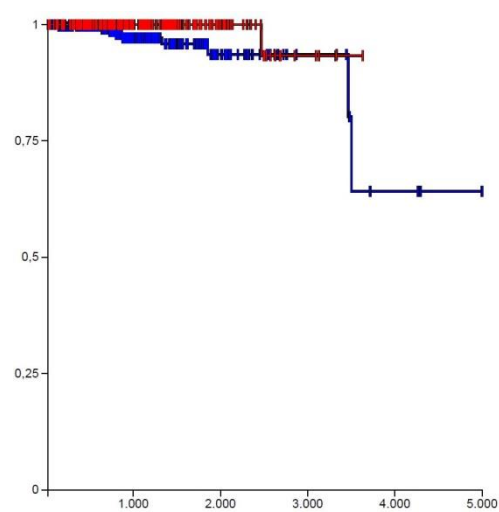




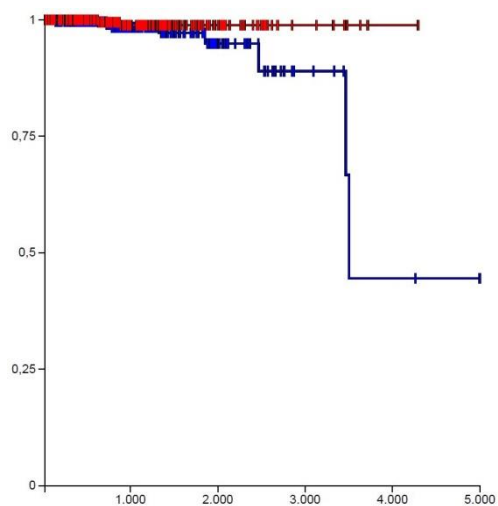
TIMP2



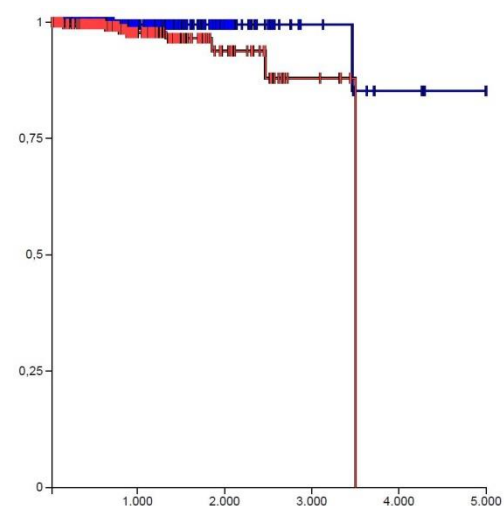
TIMP3



GPX3



TRP53



| Gene   | Valores de p | Gene  | Valores de p |
|--------|--------------|-------|--------------|
| AR     | 0.6235       | PTEN  | 0.4238       |
| CAV2   | 0.5271       | RB1   | 0.963        |
| DAB2IP | 0.8605       | SFN   | 0.7194       |
| DKK3   | 0.1236       | SFRP1 | 0.09855      |
| GPX3   | 0.048        | SOCS3 | 0.3565       |
| GSTP1  | 0.2988       | TIMP2 | 0.3674       |
| INTS6  | 0.8373       | TIMP3 | 0.02248      |
| NFKB1  | 0.2773       | TRP53 | 0.009269     |