



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

RAFAELA SALGADO FONTENELE

ANÁLISE DO PAPEL DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA
MANUTENÇÃO DO ESTADO TUMORAL NO MODELO CÂNCER
DE PRÓSTATA *IN VITRO*

BRASÍLIA

2014

RAFAELA SALGADO FONTENELE

ANÁLISE DO PAPEL DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA
MANUTENÇÃO DO ESTADO TUMORAL NO MODELO CÂNCER
DE PRÓSTATA *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José R. Corrêa

Co-Orientadora: Prof. Dr^a. Kelly G. Magalhães

BRASÍLIA

2014

RAFAELA SALGADO FONTENELE

ANÁLISE DO PAPEL DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA
MANUTENÇÃO DO ESTADO TUMORAL NO MODELO CÂNCER
DE PRÓSTATA *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Raimundo Corrêa (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Andrea Queiroz Maranhão (Membro efetivo)

Prof^a. Dr^a. Patrícia Elaine de Almeida – UFJF (Membro efetivo)

Prof^a. Dr^a. Marcella Lemos Brettas Carneiro (Membro suplente)

"Ganhamos força, coragem e confiança a cada experiência em que verdadeiramente paramos para enfrentar o medo." (Eleanor Roosevelt)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a minha família. Em especial à minha mãe Silvia, ao meu pai Roberto e a minha irmã Marina, agradeço pela paciência ao longo desses anos, pelo apoio e amor incondicional, e principalmente por acreditarem em mim e nos meus sonhos. O amor que sinto por vocês é tanto que não cabe em mim!

Às minhas colegas de bancada e minhas amigas queridas, Bruna e Nathalia, agradeço pelo aprendizado e acima de tudo pela paciência e carinho. Sem vocês eu não estaria aqui hoje. Saibam que sempre podem contar comigo para o que precisarem.

Agradeço às colegas de bancada, Núbia, Yasmim e Catharine, pela parceria e carinho. Aos colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica, pois aprendi muita coisa com cada um de vocês, agradeço por todas as conversas, saídas, festinhas, ajudas e por tornarem meus dias mais leves e alegres.

Aos meus amigos Pedro, Nathalia e Diogo, amizades especiais que o mestrado me proporcionou, agradeço por todos os momentos de diversão, por todo apoio e carinho. Em especial, agradeço ao Pedro por todo o ensinamento, paciência e motivação.

Aos meus Bioamigos do “semestre mais legal”, que são como irmãos para mim e que vão fazer parte da minha vida para sempre. Somos uma família, e agradeço por todo o amor. Em especial as amigas-irmãs Clara, Lígia, Martha e Nina, por serem mulheres maravilhosas que me trazem tanto crescimento e força.

Aos meus amigos Espartanos, por me proporcionarem muitos momentos de alegria e por sempre estarem ao meu lado me incentivando. Em especial aos meus grandes amigos Ana, Laura e Hikari, que para mim são como irmãos amorosos com quem eu posso contar para tudo e para sempre. Amo muito!

Aos meus colegas dos grupos Kuramyin e Lua Nova, que sempre me deram tanto carinho, renovando minhas energias e sempre me ajudando a estar cada vez melhor.

Aos colegas do laboratório LIM1, pelo suporte.

Aos meus orientadores Prof. José Raimundo Corrêa e Prof^a Kelly Grace Magalhães pela oportunidade e também por todo o suporte durante os anos de estudo e pesquisa.

Aos colegas da Virologia, agradeço por toda ajuda e atenção, sendo sempre muito prestativos e auxiliando com equipamentos e regentes. Especialmente os Professores Dr. Renato Resende e Dr. Tatsuya Nagata pela disposição de auxílio na pesquisa.

Ao curso de Biologia, por me proporcionar momentos inesquecíveis, amizades eternas e pelo amadurecimento pessoal.

À Universidade de Brasília, pelo aperfeiçoamento profissional de qualidade.

A Deus Pai-Mãe.

Ao CNPq e à FAPDF pelo apoio financeiro.

RESUMO

O câncer de próstata é a segunda neoplasia mais frequente em homens no mundo e também no Brasil. Os fatores de risco mais consolidados para o seu desenvolvimento são a idade avançada, histórico familiar e fatores ambientais. Um dos fatores ambientais mais estudados é a inflamação, que pode ser desencadeada por agentes infecciosos, hábitos alimentares, mudanças hormonais, alterações fisiológicas como refluxo de urina ou traumas físicos. Entretanto, em alguns casos, amostras histopatológicas da próstata podem apresentar infiltrado inflamatório sem motivo aparente. Neste contexto, a proposta foi avaliar o papel dos mediadores inflamatórios presentes no microambiente inflamatório tumoral e a sua relação com a dinâmica celular do câncer de próstata. Para simular o microambiente inflamatório tumoral, foi utilizado meio condicionado de células mononucleares de sangue periférico humano, estimuladas ou não com moduladores inflamatórios, nas linhagens celulares de câncer de próstata DU145 e LNCaP. Das citocinas avaliadas, foi detectada a secreção de IL-1 β e IL-6. A secreção de IL-1 β indica que há formação do inflamassoma e ativação de caspase1. Observou-se aumento da expressão do receptor NLRP3 nas linhagens celulares DU145 e LNCaP e também aumento ou diminuição na clivagem de PARP1 dependendo do estímulo inflamatório. Esses dados juntamente com a observação de fragmentação de DNA, indicam que pode estar ocorrendo morte celular por piroptose. O estímulo inflamatório também levou à modulação da expressão de PPAR- γ nas linhagens tumorais, no entanto essa modulação parece não estar correlacionada a nenhum dos outros eventos observados. Quanto às propriedades tumorais, observou-se após estímulos inflamatórios um aumento na população de células tronco tumorais na linhagem DU145 e aumento de células CD44+/CD24+ na linhagem LNCaP, o que indica um maior potencial metastático nessas células. Foi observado também, uma redução da taxa de proliferação celular apenas na linhagem LNCaP e não foram identificadas mudanças significativas na dinâmica do ciclo celular em ambas as linhagens estudadas. Com base nestes resultados podemos sugerir que o microambiente inflamatório exerce um papel regulatório nas linhagens tumorais de próstata DU145 e LNCaP. Esse processo

parece estar relacionado à ativação do inflamassoma e consequente secreção IL-1 β aumentando a população de células tronco tumorais, o que está diretamente relacionado com o agravo da doença. Desta forma nossos dados sugerem que os processos inflamatórios no câncer da próstata podem levar a eventos de impacto negativo para os portadores da doença, favorecendo fenótipos associados à metástase. Por outro lado, nossos resultados também mostram um provável horizonte a ser explorado no tratamento do câncer de próstata com o uso de agentes anti-inflamatórios adjuvantes aos tratamentos tradicionais.

Palavras-chave: Câncer de Próstata; Inflamação; Inflamassoma; NLRP3; Células Tronco Tumorais.

ABSTRACT

Prostate cancer is the second leading cause of cancer in men worldwide and also in Brazil. The most well known risk factors for the development of this cancer are advanced age, family history and environmental factors. Inflammation is one of the most studied environmental factors and can be triggered by infections, dietary factors, hormonal changes and others environmental factors such as physical trauma or urine reflux. However, in some cases, histopathological prostate cancer samples can exhibit immune infiltrate without any apparent reason. In this context, our proposal was to evaluate the role of inflammatory mediators observed in the inflammatory tumor microenvironment and its relationship with the prostate cancer cell dynamics. To simulate the inflammatory tumor microenvironment, conditioned medium of human peripheral blood mononuclear cells stimulated or not with inflammatory modulators was used. From the cytokines evaluated, the secretion of IL-1 β and IL-6 was detected. The secretion of IL-1 β indicates inflammasome assemble and caspase1 activation. We observed increased expression of NLRP3 receptor in DU145 and LNCaP cells and also increase or decrease in PARP1 cleavage depending on the inflammatory stimuli. These data plus the DNA fragmentation detected, indicates that cell death may be occurring by pyroptosis. The inflammatory stimuli also led to modulation of PPAR- γ expression in the prostate cancer cell lines, however this modulation does not appears to be correlated with any of the others analyzed properties. Regarding the tumor properties, after inflammatory stimuli it was observed a population increase of cancer stem cells from DU145 and CD44+/CD24+ phenotype increase in LNCaP cells, which indicates an amplified metastatic potential in these cells. It was also observed in LNCaP, a reduction in cell proliferation rates and no significant changes were identified in the cell cycle dynamics from both cell lines studied. Based on these results we can suggest that the inflammatory microenvironment plays a regulatory role in prostate cancer cell lines. This process seems to be related to the inflammasome activation and consequent IL-1 β secretion leading to increased cancer stem cells population, which is directly related to a poor prognostic for this disease. Thus our data indicated that inflammatory processes in prostate cancer might lead to adverse events with negative disease impact for patients, favoring phenotypes associated with metastasis. Furthermore, indirectly our results also suggest that

the use of anti-inflammatory drugs as adjuvants to traditional treatments for prostate cancer may improve the patient's prognostic.

Keywords: Prostate Cancer, Inflammation; Inflammasome, NLRP3; Cancer Stem Cells.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estimativas de câncer para o Brasil em 2014	4
Figura 2. Modelo celular do desenvolvimento do câncer de próstata	7
Figura 3. Modelo de ativação do inflamassoma NLRP3	10
Figura 4. Esquema demonstrando os tempos e estímulos utilizados no desenvolvimento do trabalho	20
Figura 5. Análise da secreção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α pelas linhagens DU145 e LNCaP após estímulo pró-inflamatório	28
Figura 6. Avaliação do ciclo celular das linhagens tumorais de próstata DU145 e LNCaP após estímulo pró-inflamatório	30
Figura 7. Estímulos pró-inflamatórios levam à fragmentação nuclear nas células das linhagens de câncer de próstata DU145 e LNCaP	31
Figura 8. Estímulo inflamatório leva à diminuição da proliferação celular nas células da linhagem de câncer de próstata LNCaP, mas não nas células da linhagem DU145	33
Figura 9. Expressão de PPAR- γ nas linhagens de câncer de próstata DU145 e LNCaP após estímulo inflamatório	34
Figura 10. Expressão das proteínas NLRP3, PPAR- γ e PARP1 clivada nas células da linhagem DU145	37
Figura 11. Expressão das proteínas NLRP3, PPAR- γ e PARP1 clivada nas células da linhagem LNCaP	38
Figura 12. Avaliação de espécies reativas de oxigênio na linhagem DU145 após estímulo inflamatório	40
Figura 13. Avaliação de espécies reativas de oxigênio na linhagem LNCaP após estímulo inflamatório	41

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Mudanças no fenótipo CD44/CD24 das células DU145 após estímulo inflamatório	43
Tabela 2. Mudanças no fenótipo CD44/CD24 das células LNCaP após estímulo inflamatório	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Receptor de Andrógeno
ASC	Proteína tipo particular associada à apoptose contendo CARD
ATP	Adenosina trifosfato
BIR	Domínio repetitivo inibitório do baculovírus
BSA	Albumina sérica bovina
NOD/SCID	Camundongos diabéticos não obesos com imunodeficiência severa
CARD	Domínio de recrutamento de caspase
CD133	Agrupamento de diferenciação 133
CD14	Agrupamento de diferenciação 14
CD15	Agrupamento de diferenciação 15
CD24	Agrupamento de diferenciação 24
CD44	Agrupamento de diferenciação 44
CFSE	Éster carboxifluoresceína succinimidil
CO ₂	Dióxido de carbono
DAMP	Padrões moleculares associados a danos celulares
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindole, diidroclorida
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidermal
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
EpCAM	Molécula de adesão de células epiteliais
ERK	Quinases reguladas por sinais extracelulares
EZH2	N-metiltransferase Histona-lisina
FITC	Fluoresceína
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
HRP	Peroxidase de raiz-forte

IFN γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IKK α	Inibidor kappa β quinase subunidade α
IKK β	Inibidor kappa β quinase subunidade β
IL18	Interleucina 18
IL1 β	Interleucina 1 β
IL6	Interleucina 6
LPS	Lipopolissacarídeo
LRR	Repetições ricas em leucina
MEK	Quinase ativada por mitógeno
MyD88	Proteína de diferenciação mielóide 88
NACHT	Domínio central de ligação a nucleotídeo
NF κ B	Fator nuclear kappa B
NLR	Receptores do tipo NOD
NLRP	Proteínas receptoras do tipo NOD
NOD	Proteína com domínio de oligomerização e de ligação a nucleotídeo xii
°C	Graus Celsius
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PARP1	Poli [ADP-ribose] polimerase 1
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fostato salino
PE	R-ficoeritrina
PI	Iodeto de propídeo
PIA	Atrofia inflamatória proliferativa
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática
PPAR- γ	Receptores ativados por proliferador de peroxissomo
Pro-IL18	Pró-interleucina 18
Pro-IL1 β	Pró-interleucina 1 β
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
PSA	Antígeno específico da Próstata
PYD	Domínio pirina

ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TLR	Receptores do tipo toll
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Câncer	1
1.2. Câncer de Próstata	3
1.3. Inflamação e o Câncer	6
1.4. Inflamassoma	8
1.5. Células Tronco Tumorais.....	10
1.6. PPAR- γ	14
1.7. Justificativa	14
1.8. Objetivos.....	15
1.8.1. Objetivo Geral	15
1.8.2. Objetivos Específicos	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1. Reagentes e Equipamentos	16
2.2. Cultivo Celular	17
2.3. Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)	18
2.4. Estímulos	19
2.5. Análise do Ciclo Celular e Fragmentação Nuclear por Iodeto de Propídeo	20
2.6. Avaliação do fenótipo CD44/CD24.....	21
2.7. Avaliação da proliferação celular por marcação com CFSE	22
2.8. Ensaio de ELISA	23
2.9. Western Blot	23
2.10. Marcação intracelular de PPAR- γ	24

2.11. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por microscopia confocal	25
2.12. Análises Estatísticas.....	25
3. RESULTADOS.....	26
3.1. Análise da secreção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , pelas linhagens DU145 e LNCaP após estímulo pró-inflamatório.....	26
3.2. Avaliação do ciclo celular das linhagens tumorais de próstata DU145 e LNCaP após estímulo pró-inflamatório.....	29
3.3. Estímulos pró-inflamatórios levam à fragmentação nuclear nas células das linhagens de câncer de próstata DU145 e LNCaP.....	31
3.4. Estímulo inflamatório leva à diminuição da proliferação celular nas células da linhagem de câncer de próstata LNCaP mas não na linhagem DU145.....	32
3.5. Expressão das proteínas NLRP3, PPAR- γ , PARP1 clivada nas células das linhagens de câncer de próstata DU145 e LNCaP.....	34
3.6. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio nas linhagens DU145 e LNCaP após estímulo inflamatório.....	39
3.7. Mudanças no fenótipo CD44/CD24 das linhagens DU145 e LNCaP após estímulo inflamatório.....	42
4. DISCUSSÃO	44
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	53
6. REFERÊNCIAS	54
7. APÊNDICES.....	62

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O desenvolvimento do câncer é um processo multifatorial e complexo, envolvendo fatores genéticos e epigenéticos (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011; YOU e JONES, 2012), em que alterações acumulativas no genoma proporcionam mudanças metabólicas determinantes ao desequilíbrio da homeostasia celular, levando à transformação de células normais em células cancerígenas. As células transformadas apresentam uma proliferação descontrolada, resistência à morte celular por apoptose e podem apresentar a capacidade de invadir outros tecidos, ocasionando as metástases (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000; 2011).

O câncer é o grupo de doenças relacionado como o principal causador de morte em países economicamente desenvolvidos e como a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento (JEMAL *et al.*, 2011). A incidência do câncer em países economicamente desenvolvidos vem aumentando como consequência do envelhecimento e do crescimento da população, assim como pela falta de exercício físico, pelo tabagismo e pelas dietas a base de produtos industrializados (JEMAL *et al.*, 2011).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 2012 foram registrados 14,1 milhões de novos casos de câncer no mundo, 57% desses casos surgiram em países em desenvolvimento (GLOBOCAN, 2012). Em comparação, o número de mortes devido ao câncer foi de 8,3 milhões sendo que 65% dos incidentes ocorreram nos países em desenvolvimento (GLOBOCAN, 2012).

No Brasil, desde a década de 60, as doenças infecciosas deixaram de ser a maior causa de morte e cederam lugar às doenças do sistema circulatório e às neoplasias (INCA, 2011). Esse processo é denominado transição epidemiológica e deve-se principalmente ao envelhecimento da população, resultante do intenso processo de urbanização e das ações de promoção e recuperação da saúde (INCA, 2014).

São estimados 576 mil novos casos de câncer no Brasil em 2014. Com exceção dos casos de câncer de pele não melanoma, 48% desses novos casos ocorrerão em mulheres, sendo o câncer de mama o mais frequente e 52% em homens, sendo o câncer de próstata o

mais frequente (INCA, 2014). A taxa de incidência global de câncer é quase 25% maior em homens do que em mulheres (GLOBOCAN, 2012).

Estudos sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no surgimento dessa doença vêm aumentando progressivamente ao longo dos anos. Em 2000, Weinberg e Hanahan publicaram uma revisão intitulada “The hallmarks of cancer” onde propuseram seis mudanças na fisiologia celular que são necessárias para o estabelecimento da neoplasia, sendo estas: autossuficiência na sinalização envolvida no crescimento celular; insensibilidade aos sinais de inibição do crescimento celular; evasão da morte celular; angiogênese; capacidade de invadir outros tecido e metástase (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Essas mudanças na fisiologia celular são consequências de processos que possibilitam a transformação celular. O câncer é uma doença que esta normalmente relacionada à idade (ERSHLER e KELLER, 2000), uma vez que é necessário acúmulo de mudanças no genoma para o seu desenvolvimento. Uma mutação apenas não é capaz de gerar um tumor e, além disso, essas mutações devem ocorrer em genes chaves para o metabolismo celular. Sendo assim, foram denominados oncogenes aqueles genes que sofrem ganho de função após a mutação levando a uma superativação, e de genes supressores de tumor aqueles que sofrem perda de função, a qual é essencial para o controle da transformação celular (BISHOP e WEINBERG, 1996). Podemos citar também outra classe de genes determinantes na tumorigênese, os genes de estabilidade ou *caretakers*, genes responsáveis pelo reparo do DNA (VOGELSTEIN e KINZLER, 2004). Mutações nesses genes promovem maior instabilidade ao genoma deixando a célula mais susceptível a novos eventos mutagênicos (FRIEDBERG, 2003; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

O processo de expansão clonal que leva a formação do tumor após mudanças no genoma, embora durante muitos anos tenha sido relacionada apenas a mutações hoje vem sendo explicada também por mudanças epigenéticas (DAWSON e KOUZARIDES, 2012). Mecanismos como metilação do DNA e modificações nas caudas de histona promovem mudanças herdáveis em genes supressores de tumor, por exemplo, levando a expansões clonais malignas

(ESTELLER, 2007; JONES e BAYLIN, 2007; BERDASCO e ESTELLER, 2010). A hipometilação nas células cancerígenas em comparação com as células normais foram as primeiras evidências do envolvimento da epigenética no estado tumoral (FEINBERG e VOGELSTEIN, 1983; GOELZ *et al.*, 1985).

Todos esses eventos citados e suas consequências, no entanto, são visões centradas na dinâmica celular individual, portanto torna-se cada vez mais clara a necessidade de compreender também o câncer como um tecido complexo que possui um microambiente tumoral (PIETRAS e OSTMAN, 2010; HANAHAN e WEINBERG, 2011; SCHIAVONI, GABRIELE e MATTEI, 2013) onde as células transformadas e a células do estroma interagem entre si, especialmente quando se estuda os tumores sólidos (VERHEUL, VOEST e SCHLINGEMANN, 2004; SCHIAVONI, GABRIELE e MATTEI, 2013). Com o desenvolvimento tumoral, o microambiente co-evolui por meio de um circuito complexo de comunicação parácrina levando ao estabelecimento do câncer maligno (PIETRAS e OSTMAN, 2010).

Sendo assim, complementando as seis mudanças já enumeradas por Hanahan e Weinberg os conhecimentos emergentes indicam a necessidade da definição de novos indicadores para o estabelecimento da neoplasia, sendo estes, a capacidade de evitar eliminação pelo sistema imune e desregulação do metabolismo energético da célula (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

1.2. Câncer de Próstata

O câncer de próstata é a segunda neoplasia mais frequente em homens no mundo (GLOBOCAN, 2012) e também no Brasil (INCA, 2014). Dados da Organização Mundial da Saúde indicam que no ano de 2012 surgiram 1,1 milhões de novos casos de câncer de próstata, o que representa 15% da incidência total de cânceres em homens (GLOBOCAN, 2012). A taxa de incidência do câncer de próstata no mundo é cerca de 2 a 5 vezes maior em países desenvolvidos (JEMAL *et al.*, 2011), o que representa cerca de 70% dos casos deste tipo de câncer (GLOBOCAN, 2012). Estas taxas são resultantes de uma grande variação de fatores de risco e práticas de diagnósticos aplicadas nesses países (JEMAL *et al.*, 2011).

Desde 1960, vem ocorrendo um aumento progressivo na incidência de câncer de próstata (GOMES *et al.*, 2008) e atualmente essa taxa varia em cerca de 25 vezes entre os países do mundo, devido a ampla utilização do teste de PSA e pela subsequente utilização de biópsia. Em contraste, a taxa de mortalidade no mundo varia cerca de 10 vezes (FERLAY *et al.*, 2010). Segundo a GLOBOCAN 2012, foram estimados 307 mil óbitos devido ao câncer de próstata no ano de 2012, representando 6,6% dos casos de morte por câncer em homens.

Para o ano de 2014, estimou-se o surgimento de 68.800 novos casos de câncer de próstata no Brasil (Figura 1) (INCA, 2014). Isso significa dizer que há uma estimativa de 70,42 novos casos para cada cem mil homens (70,42/100.000). Esse número representa um aumento de 6.000 novos casos em comparação ao previsto para o ano de 2012 (INCA, 2011). As regiões de maior frequência de novas incidências do câncer de próstata no país são Sudeste, Sul e Centro-Oeste com cerca de 35.980, 12.830 e 4.580 novos casos, respectivamente (INCA, 2014).

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Figura 1. Estimativas de câncer para o Brasil em 2014. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 no Brasil por sexo, exceto o câncer de pele não melanoma. Figura adaptada do (INCA, 2014).

Os fatores de risco mais consolidados para o desenvolvimento do câncer de próstata são a idade avançada e o histórico familiar (SFANOS e DE MARZO, 2012). Fatores relacionados ao estilo de vida como a dieta e os níveis de andrógeno também são reconhecidos como contribuintes para o desenvolvimento da doença (NELSON, DE MARZO e ISAACS, 2003; RICKE *et al.*, 2012). Como componentes hereditários e

ambientais estão fortemente envolvidos na etiologia do câncer de próstata, em países como os Estados Unidos, onde é adotada uma dieta rica em carnes e gordura animal, com pouca ingestão de verduras e frutas (DE MARZO *et al.*, 2007) encontram-se um dos maiores índices de incidência e mortalidade para este tipo de câncer (GLOBOCAN, 2012). Assim como nos Estados Unidos, esses índices também se apresentam elevados nos países da Europa ocidental, em que as maiores taxas de incidência ocorrem na população de negros e as menores taxas ocorrem na população de asiáticos (HSING, TSAO e DEVESA, 2000). A taxa de mortalidade para o câncer de próstata também é maior nas populações de homens negros e menor na população de homens na Ásia (GLOBOCAN, 2012).

Alguns dos tratamentos mais indicados para o câncer de próstata localizado são prostatectomia radical, radioterapia externa ou intersticial, ultrassom focalizado de alta intensidade ou terapia de privação de andrógenos (WILT e THOMPSON, 2006; WILT e AHMED, 2013). A prostatectomia radical é o tratamento mais utilizado nos estágios iniciais da neoplasia e consiste na remoção cirúrgica da próstata e alguns linfonodos próximos à região. A radioterapia consiste em aplicar múltiplas doses de radiação. A aplicação pode ser externa ou intersticial, por meio da implantação de sementes radioativas (braquiterapia). O ultrassom focalizado de alta intensidade promove um aumento da temperatura na área aplicada levando à destruição do tecido neoplásico. A terapia de privação de andrógenos é um dos tratamentos mais utilizados para os estágios avançados do câncer de próstata. A privação hormonal pode ser feita por meio da retirada cirúrgica dos testículos (orquitectomia bilateral), utilização de análogos do hormônio liberador do hormônio luteinizante, utilização de estrógenos e anti-andrógenos puros ou mistos. Embora inicialmente todos os pacientes respondam à terapia de privação de andrógenos, um taxa elevada desses pacientes apresentam recidiva com crescimento tumoral resistente à terapia (DUTT e GAO, 2009). Em alguns casos, o crescimento tumoral independente de andrógeno desencadeia um processo inflamatório com recrutamento de células do sistema imune como linfócitos T e B (AMMIRANTE *et al.*, 2010). Apesar desta resposta indesejada, a privação de andrógenos permanece como a terapia mais eficaz contra o câncer de próstata avançado, levando à morte celular e à queda de 90% dos níveis de PSA (HARRIS *et al.*, 2009).

1.3. Inflamação e o Câncer

A primeira evidência da ligação entre a inflamação e a neoplasia foi encontrada no século 19 por Rudolf Virchow, que observou a presença de leucócitos infiltrados na massa tumoral (BALKWILL e MANTOVANI, 2001). Atualmente, sabe-se que praticamente todos os cânceres possuem um infiltrado de células do sistema imune em quantidades bem variáveis, desde um infiltrado basal até uma inflamação crônica com infiltrados de leucócitos, como macrófagos, e com menos frequência células plasmáticas e eosinófilos (PAGES *et al.*, 2010; SFANOS e DE MARZO, 2012).

Cerca de 20% dos cânceres que se desenvolvem em adultos resultam de um estado inflamatório ou inflamação crônica (AGGARWAL, VIJAYALEKSHMI e SUNG, 2009). Além disso, a inflamação sempre está associada ao câncer mesmo que o desenvolvimento inicial do câncer não esteja diretamente relacionado ao processo inflamatório (MANTOVANI *et al.*, 2008). Algumas das características da inflamação associada ao tumor são: a presença de macrófagos associados ao tumor (TAM), mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas, a ocorrência de remodelamento tecidual, angiogênese e metástase (MANTOVANI *et al.*, 2008; MAN *et al.*, 2013). Os macrófagos associados ao tumor normalmente apresentam dois fenótipos. O fenótipo M1 responde à ativação clássica por interferon γ (IFN γ) e promove ações antitumorais, já o fenótipo M2 é ativado em resposta a IL-4 e IL-13 e promove remodelamento tecidual, imunoregulação e progressão tumoral (MANTOVANI *et al.*, 2002; MANTOVANI e SICA, 2010).

As razões para o surgimento da inflamação podem variar, podendo estar relacionada a fatores extrínsecos como infecções ou influências ambientais e a fatores intrínsecos como mutações em genes associados à indução inflamatória (MANTOVANI *et al.*, 2008). Além disso, a senescência celular associado à inflamação pode levar ao desenvolvimento da tumorigênese (PRIBLUDA *et al.*, 2013). A inflamação desencadeada por infecções surge como forma de eliminar o agente infeccioso, no entanto em muitos casos os patógenos tumorigênicos são capazes de subverter a ação do sistema imune e estabelecer uma infecção persistente associada a uma inflamação crônica (GRIVENNIKOV, GRETEN e KARIN, 2010).

A região da próstata é extremamente susceptível a inflamações. Diversos trabalhos mostram que a inflamação crônica local é um componente ambiental que vem se destacando como potencial fator de risco para o câncer de próstata (DE MARZO *et al.*, 2007; GUERON, DE SIERVI e VAZQUEZ, 2012; SFANOS e DE MARZO, 2012). Essa inflamação pode ser causada por agentes infecciosos, hábitos alimentares, mudanças hormonais dentre outras exposições ambientais como refluxo de urina ou traumas físicos (DE MARZO *et al.*, 2007). Por outro lado, amostras histológicas de câncer de próstata exibem, frequentemente, lesões com infiltrados inflamatórios sem uma explicação aparente e essas lesões estão normalmente associadas a uma atrofia epitelial local com atividade proliferativa aumentada em relação ao epitélio normal, sendo assim denominada atrofia inflamatória proliferativa (PIA) (DE MARZO *et al.*, 1999). Amostras teciduais de pacientes com hiperplasia benigna da próstata, que ocorre na área de transição da próstata, também apresentam um infiltrado inflamatório. (DE MARZO *et al.*, 2007). A atrofia inflamatória proliferativa normalmente está associada a um estágio inicial de transformação celular levando à formação na neoplasia intraepitelial da próstata e posteriormente ao câncer com potencial metastático (Figura 2).

O uso de anti-inflamatórios parece reduzir o risco do câncer de próstata, indicando que existe uma ligação entre a inflamação e o desenvolvimento da neoplasia prostática. Estudos com casos controlados sugerem uma diminuição de 15-20% no risco de câncer de próstata em usuários frequentes de aspirina ou drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (CHAN *et al.*, 2006; SHEBL *et al.*, 2012) e esse efeito também já foi observado em câncer de mama (GIERACH *et al.*, 2008).

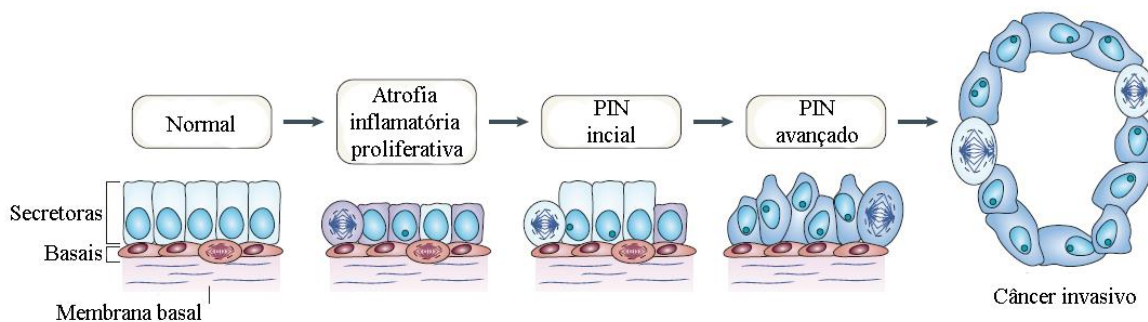


Figura 2. Modelo celular do desenvolvimento do câncer de próstata. Modelo com as diferentes etapas observadas a nível histológico e celular durante o desenvolvimento do câncer de próstata. Inicialmente o tecido normal apresenta uma atrofia inflamatória proliferativa (PIA). A ativação inflamatória constante pode levar ao surgimento da neoplasia intraepitelial da próstata (PIN) e posteriormente no câncer invasivo com potencial metastático. Imagem adaptada de (DE MARZO *et al.*, 2007).

Um dos tratamentos mais utilizados para o câncer de próstata é privação de andrógenos. Tumores que regredem após a terapia de privação de andrógenos apresentam infiltrados de leucócitos, incluindo células B, com ativação de $IKK\beta$ que resulta na secreção de citocinas que ativam $IKK\alpha$ e $STAT3$, contribuindo para à sobrevivência do câncer independente de hormônio (AMMIRANTE *et al.*, 2010). Desta forma, o estudo dos elementos moleculares que ligam os processos inflamatórios à manutenção do estado tumoral é altamente relevante, podendo apontar alvos estratégicos para terapias que venham a prevenir, controlar ou erradicar o câncer de próstata e/ou as recidivas, reduzindo os agravos desta doença.

1.4. Inflamassoma

Inflamassomas são complexos multiproteicos que funcionam como plataformas para a ativação da caspase-1, levando em seguida à clivagem das citocinas pró-inflamatórias pró-IL-1 β e pró-IL-18 o que as converte para as suas formas ativas (Figura 3) (SCHRODER e TSCHOPP, 2010). O inflamassoma vem sendo destacado como importante regulador do sistema imune inato (LAMKANFI, 2011). A IL-1 β e a IL-18 estão ligadas a diversos efeitos biológicos associados aos processos de infecção, inflamação e respostas autoimunes (SIMS e SMITH, 2010).

A formação desse complexo proteico tem como plataforma os receptores de reconhecimento de padrões (PRR) da família de receptores do tipo NOD (NLR) ou da família da proteína HIN-200 (LAMKANFI *et al.*, 2007). A família NLR é caracterizada pela presença de um domínio central de ligação a nucleotídeo (NACHT), que normalmente é flanqueado por uma região C-terminal rica em leucina (LRRs) e um domínio N-terminal de recrutamento de caspase (CARD), domínio pirina (PYD) ou ainda domínio repetitivo inibitório do baculovírus (BIR) (DAVIS, WEN e TING, 2011). Esses receptores são intracelulares e detectam perturbações citosólicas promovidas pela detecção de padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos celulares (DAMPs) (SCHRODER e TSCHOPP, 2010).

O inflamassoma NLRP3 é o mais estudado até hoje, ele pode ser ativado por perturbações na fisiologia celular como permeabilização da membrana mitocondrial e/ou lisossomal, liberação de espécies reativas de oxigênio e efluxo de potássio (GROSS *et al.*, 2011). O NLRP3 não possui o domínio CARD e por isso a formação do complexo proteico nessa plataforma depende da proteína adaptadora ASC (PYCARD) (DAVIS, WEN e TING, 2011). Em macrófagos primados com LPS ocorre ativação de caspase1 mediada por NLRP3 quando há exposição das células a moléculas de ATP extracelular (MARIATHASAN *et al.*, 2006), esse ATP extracelular é reconhecido pelo receptor P2X7, caracterizando um DAMP (FERRARI *et al.*, 1997; IYER *et al.*, 2009). Cristais de ácido úrico também são caracterizados como DAMPs capazes de ativar o inflamassoma NLRP3 e promover secreção de IL-1 β (MARTINON *et al.*, 2006). Além disso, agonistas de NLRP3 levam à liberação de espécies reativas de oxigênio promovendo a ativação do inflamassoma (CRUZ *et al.*, 2007; CASSEL *et al.*, 2008; DOSTERT *et al.*, 2008).

Não se sabe ao certo ainda quais os mecanismos que levam à secreção de IL-1 β e IL-18 após sua maturação dependente de caspase1, uma vez que essas proteínas não possuem o peptídeo sinal de reconhecimento pelo retículo endoplasmático/aparato de Golgi, a via mais convencional de secreção celular (NICKEL e RABOUILLE, 2009). Algumas hipóteses propostas indicam que essa secreção pode ocorrer via exossomo independente de aparato de Golgi ou lisossomo (NICKEL e RABOUILLE, 2009), e ainda pode estar relacionada à morte celular inflamatória regulada pela ativação de caspase1 mediada por inflamassoma denominada piroptose (LAMKANFI, 2011).

A piroptose é um tipo de morte celular que se diferencia da apoptose principalmente pela formação de poros de 1-2 nm na membrana plasmática levando à liberação do conteúdo citoplasmático (FINK e COOKSON, 2006) e também por ser dependente de caspase1 e apresentar secreção de IL-1 β e IL-18. No entanto, já foi demonstrado que a piroptose ocorre independentemente da secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (MONACK, DETWEILER e FALKOW, 2001). No entanto, a apoptose e a piroptose também exibem algumas semelhanças como a condensação da cromatina, fragmentação nuclear e clivagem de PARP1 (STRASSER, O'CONNOR e DIXIT, 2000; FINK e COOKSON, 2006). Alguns estudos reportam que em alguns casos a piroptose pode ocorrer sem que a clivagem de PARP1 seja necessária (CHEN *et al.*, 1996).

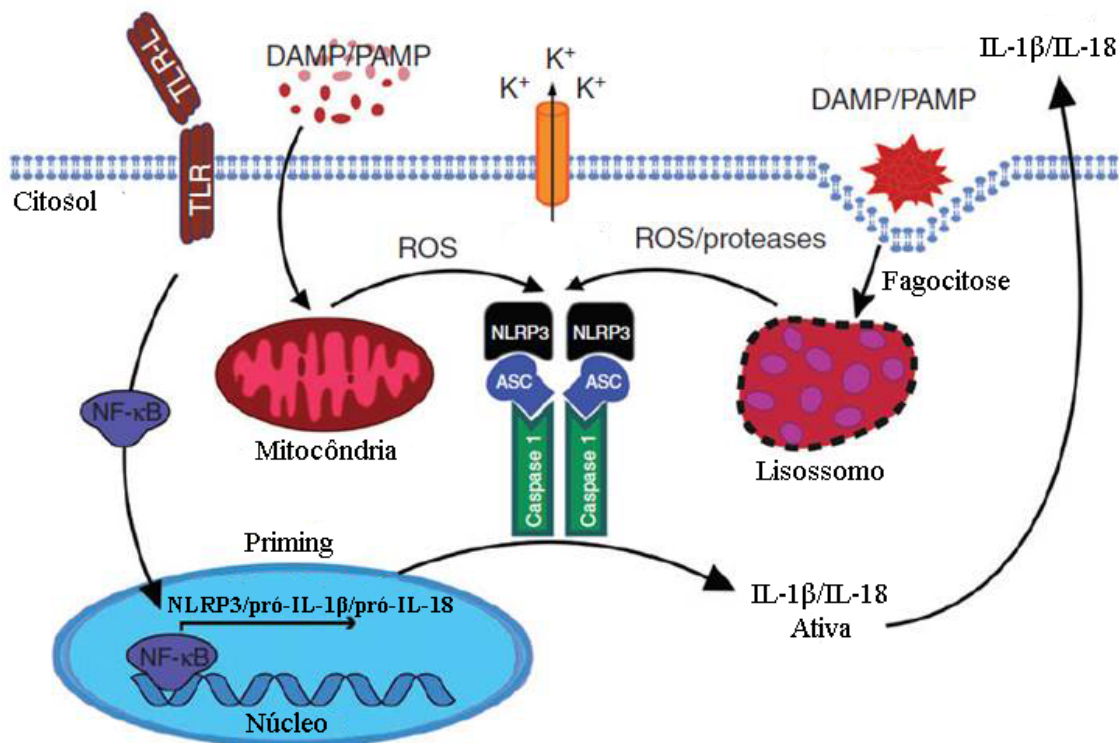


Figura 3. Modelo de ativação do inflamassoma NLRP3. São necessários dois sinais de ativação para que ocorra a formação do inflamassoma. O primeiro sinal denominado de *priming* deve ser um estímulo capaz de induzir o fator de transcrição NF- κ B promovendo a expressão do receptor NLRP3 e também dos precursores das citocinas não ativas pró-IL-1 β e pró-IL-18. O *priming* normalmente ocorre via ativação de receptores do tipo Toll (TRL) (descrito), receptores de TNF- α ou receptores de IL-1R. Padrões moleculares associados a patógenos ou a danos celulares (PAMP ou DAMP) funcionam como segundo sinal de ativação. Esses estímulos podem levar a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), efluxo de potássio ou dano lisossomal que por sua vez leva a formação do complexo inflamassoma. O inflamassoma, formado pelo receptor NLRP3, a proteína adaptadora ASC e caspase-1, promove a ativação da caspase-1, levando em seguida à clivagem das citocinas pró-inflamatórias pró-IL-1 β e pró-IL-18 o que as converte para as suas formas ativas IL-1 β e IL-18. Figura adaptada de (MENU e VINCE, 2011).

1.5. Células Tronco Tumorais

Células tronco tumorais, assim como as células tronco normais, podem se diferenciar em qualquer tipo celular no contexto tumoral (JAGGUPILLI e ELKORD, 2012). Por exemplo, foi demonstrado que células tronco tumorais podem formar tecido endotelial em glioblastomas (WANG *et al.*, 2010). Os marcadores de superfície CD44 e CD24 vêm sendo utilizados em conjunto com outros marcadores moleculares como CD15, CD133 e EpCAM, para identificar e isolar células tronco tumorais (SLOMIANY *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2010; RASSOULI *et al.*, 2013). O fenótipo CD44⁺/CD24⁻ presente nas

células tronco tumorais foi primeiramente identificado em células de câncer de mama (AL-HAJJ *et al.*, 2003), abrindo o caminho para o estudo nos demais tipos de câncer. Neste contexto, a CD44 pode ser empregada como um marcador de células tronco tumorais em diversos tumores (DU *et al.*, 2008).

CD44 é uma glicoproteína transmembrana que pode atuar como receptor para o ácido hialurônico e é altamente expressa em diversos tipos de câncer (PONTA, SHERMAN e HERRLICH, 2003; NAOR *et al.*, 2008). Essa proteína se associa a outras proteínas que monitoram mudanças extracelulares e desempenha papel central na regulação da adesão celular, proliferação, sobrevivência, motilidade, angiogênese e diferenciação (DU *et al.*, 2008). A expressão de CD44 por células tumorais é também associada à interação com osteopontina promovendo modulação das funções celulares contribuindo com a progressão tumoral (RANGASWAMI, BULBULE e KUNDU, 2006; IQBAL *et al.*, 2014). CD44 pode ainda interagir com elementos da matriz extracelular como colágeno, laminina e fibronectina, no entanto, a função fisiológica desta associação ainda não é compreendida (JAGGUPILLI e ELKORD, 2012). Finalmente, o fenótipo CD44 está associado ao aumento do potencial tumorigênico e metastático em diversos tipos de câncer *in vivo* incluindo o câncer de próstata (SY, GUO e STAMENKOVIC, 1991; SANAAT *et al.*, 2013; FENG *et al.*, 2014). Diversas linhagens celulares de câncer de próstata com alta expressão de CD44 apresentam características de células tronco tumorais como alto potencial tumorigênico e metastático, levando à formação de tumores em camundongos imunodeficientes (NOD/SCID) (PATRAWALA *et al.*, 2006).

A CD24 é uma outra proteína de superfície celular muito importante no estudo do câncer e esta associada ao fenótipo de células tronco tumorais. Embora esta molécula tenha sido reconhecida como marcador molecular para as células tronco tumorais, existem muitas ideias divergentes quanto a relação da expressão desse marcador e o prognóstico da doença (KRISTIANSEN, SAMMAR e ALTEVOGT, 2004; ABRAHAM *et al.*, 2005). CD24 é uma pequena proteína ancorada a superfície das células através de sua associação covalente a um glicolípido denominado glicosil fosfatidil inositol (GPI). A CD24 é uma proteína glicosilada, encontrada em uma ampla variedade de tipos de câncer, com função de promover a interação célula/célula e célula/matriz extracelular (KRISTIANSEN, SAMMAR e ALTEVOGT, 2004; SHIMAMURA *et al.*, 2014). Esta proteína atua como

ligante alternativo de P-selectina, um receptor de adesão encontrado em plaquetas e células endoteliais. A associação do CD24 com a P-selectina facilita a passagem das células tumorais para a corrente sanguínea contribuindo com o processo de metástase (JAGGUPILLI e ELKORD, 2012). No entanto, o papel do CD24 parece ser diferente dependendo do tipo de câncer considerado. No câncer do pâncreas, a alta expressão de CD24 está associada à inibição da evasão e da metástase (TANIUCHI, NISHIMORI e HOLLINGSWORTH, 2011). Da mesma forma, estudos com a linhagem celular A549 de adenocarcinoma pulmonar humano, demonstraram a não aplicabilidade deste marcador para células tronco tumorais neste modelo (ROUDI *et al.*, 2013).

Células tronco tumorais com o fenótipo CD44⁺/CD24⁻ foram isoladas de diversas linhagens celulares de câncer de próstata e foram capazes de promover tumorigênese *in vivo* (HURT *et al.*, 2008). Além disso, essas células possuem capacidade de diferenciação, pois exibem uma alta expressão de genes relacionados a essa capacidade e formam esferas não aderentes em ágar denominadas prostatosferas (HURT *et al.*, 2008). Mudanças na expressão de moléculas de adesão podem promover um desequilíbrio na ligação epitélio-mesenquimal levando a uma desorganização tecidual característica de tumores (GOODISON, URQUIDI e TARIN, 1999).

A transição epitélio-mesenquimal (EMT) é caracterizada pela perda de adesão célula-célula mediada por E-caderina, perda da adesão à matriz extracelular mediada por integrina e rupturas na membrana basal, que são processos necessários para que o câncer seja capaz de invadir outros tecidos (THIERY, 2002; HUGO *et al.*, 2007). Em condições normais a EMT é fundamental durante o processo de desenvolvimento embrionário, mas também é fundamental para que ocorra a migração e invasão de células cancerígenas a sítios reservados a outros tecidos e/ou corrente sanguínea e linfática promovendo o agravamento do câncer conhecido como metástase (HUBER, KRAUT e BEUG, 2005). Logo, o fenômeno EMT é utilizado pelas células tumorais como forma de propagação para os demais tecidos, e essa característica vem sendo muito correlacionado à subpopulação de células tronco tumorais. Células tronco tumorais da próstata apresentam a capacidade de invasão *in vitro* através do processo de EMT e apresentam a mesma assinatura de genes responsáveis pela capacidade de diferenciação presentes em células tronco normais

(KLARMANN *et al.*, 2009). Essas mesmas células foram suficientes para levarem à formação de tumores em camundongos (KLARMANN *et al.*, 2009).

As células tronco tumorais são uma subpopulação celular presente na massa tumoral, representada por poucas células, que possuem alta capacidade proliferativa (COLLINS *et al.*, 2005). Por se tratar de células menos diferenciadas, as células tronco tumorais da próstata com o fenótipo CD44⁺/CD24⁻ apresentaram a capacidade de autorenovação (HURT *et al.*, 2008), ou seja, a partir da subpopulação de células tronco tumorais, o câncer pode se restabelecer mantendo a população diferenciada e desdiferenciada. Essa característica explica em parte a quantidade de recidivas após o tratamento de câncer de próstata com privação de andrógenos.

Levando em consideração essa capacidade de manutenção do tumor e disseminação do tumor pelo organismo, as células tronco tumorais se tornam um alvo terapêutico muito importante. Além disso, é necessário entender como ocorre a formação dessa subpopulação durante o desenvolvimento da doença. Alguns estudos vêm apontando para aspectos importantes da regulação das células tronco tumorais. Foi demonstrado que o bloqueio por silenciamento gênico de EZH2, uma enzima catalítica que promove a metilação das histonas (SEWALT *et al.*, 1998), leva à diminuição na proliferação celular e parada na fase G0/G1 do ciclo celular em células tronco tumorais da próstata (LI *et al.*, 2013). Isto demonstra que essa enzima é necessária para a manutenção e talvez até para o surgimento dessa subpopulação. Além disso, já foi demonstrado também que a via MEK/ERK, cuja ativação ocorre por meio da sinalização pelo fator de crescimento epidermal (EGF), é essencial para a propagação de células tronco tumorais da próstata (RYBAK, INGRAM e TANG, 2013).

A ação dos elementos de comunicação presentes no ambiente inflamatório e a sua relação com as células normais e tumorais no câncer de próstata ainda não é completamente compreendida. Sendo assim, estudos que liguem a inflamação e as propriedades tumorais são altamente relevantes para o entendimento de processos ainda obscuros na biologia do câncer de próstata.

1.6. PPAR- γ

Células cancerígenas em alguns casos exibem um metabolismo de lipídeo alterado levando a uma alta taxa de síntese lipídica. Tal processo ocorre principalmente em decorrência da biogênese de membrana plasmática uma vez que a taxa de divisão celular no câncer é muito alta (SUBURU e CHEN, 2012). O PPAR- γ é membro da família de receptores nucleares hormonais (LEMBERGER, DESVERGNE e WAHLI, 1996). Essa proteína atua como fator de transcrição após formar heterodímeros com receptores retinóicos X (RXRs) e se liga a elementos responsivos específicos (PPREs) presentes nas sequências dos genes alvos (MANGELSDORF e EVANS, 1995). Os genes alvos desse fator de transcrição estão envolvidos no metabolismo lipídico, armazenamento de lipídeo, proliferação celular, sinalização da via da insulina e produção de adipocinas (SIKKA *et al.*, 2012). PPAR- γ possui três variantes de transcritos denominados PPAR- γ 1, PPAR- γ 2, e PPAR- γ 3 e todas as isorformas são encontradas em humanos e altamente expressa nos tecidos adiposos (FAJAS *et al.*, 1997). PPAR- γ também é expressa em outros tipos celulares e tem sido relatada uma alta expressão dessa proteína em células epiteliais cancerígenas (FAJAS, DEBRIL e AUWERX, 2001). No entanto, a ativação de PPAR- γ via agonistas foi relacionada com uma diminuição na proliferação celular em células de câncer de próstata (KUBOTA *et al.*, 1998; SHAPPELL *et al.*, 2001), e também pela inibição da invasibilidade em células de câncer de fígado (PANG *et al.*, 2013). Além disso, agonistas e ligantes de PPAR- γ foram propostos para o tratamento de cânceres responsivos a hormônio como câncer de mama (CATALANO *et al.*, 2011) e câncer na tireoide (ANTONELLI *et al.*, 2012; SMALLRIDGE *et al.*, 2013).

1.7. Justificativa

O câncer de próstata é a segunda neoplasia mais frequente entre homens no Brasil. Estima-se o surgimento de 68.800 novos casos de câncer de próstata para o Brasil para o ano de 2014 (INCA, 2014). Esta neoplasia está associada a diversos fatores de risco, sendo um deles a presença de inflamação local. Esta inflamação se caracteriza por uma atrofia da área epitelial e por infiltrações de células do sistema imune. Estudos que associem o

microambiente inflamatório ao surgimento, manutenção e agravamento do câncer de próstata são muito recentes e escassos e, por este motivo, não há um entendimento claro acerca dessas interações.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi analisar a dinâmica entre o câncer de próstata e os processos inflamatórios, de forma a contribuir para o entendimento da biologia do câncer de próstata, bem como com a identificação de prováveis novos alvos para o tratamento quimioterápico tradicional e/ou para terapias adjuvantes.

1.8. Objetivos

1.8.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel de mediadores inflamatórios secretados na dinâmica celular do câncer de próstata *in vitro*.

1.8.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a secreção de citocinas pró-inflamatórias nas linhagens de câncer de próstata DU145 e LNCaP;
- Analisar o comportamento celular das linhagens celulares de câncer de próstata DU145 e LNCaP sob estímulos de mediadores inflamatórios quanto ao ciclo celular, fragmentação nuclear e proliferação celular;
- Avaliar a expressão das proteínas NLRP3, PPAR- γ , PARP1 clivada nas linhagens de câncer de próstata DU145 e LNCaP sob estímulos inflamatórios;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio nas linhagens de câncer de próstata DU145 e LNCaP mediante estímulos inflamatórios;
- Avaliar o papel do estímulo inflamatório na modulação da população de células tronco tumorais nas linhagens de câncer de próstata DU145 e LNCaP.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes e Equipamentos

Na manutenção das células em cultura, foram utilizados DMEM, RPMI, SFB, Tripsina 0,25% em EDTA, todos obtidos da empresa GIBCO – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA. Para a obtenção de PBMC, foram utilizados Histopaque e DMSO da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA. Como estímulos pró-inflamatórios foram utilizados o LPS e ATP da Invivogen, San Diego, CA, EUA.

Na quantificação de citocinas foram empregados os kits de ELISA para IL-1 β , IL-6 e TNF- α da BD Biosciences, Inc. Nas análises por citometria de fluxo os reagentes utilizados foram: Iodeto de Propídeo da Molecular Probes – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA; RNase livre de DNase, CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, todos da Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA; anti-PPAR- γ conjugado a FITC (SC-7273) da Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA e Colchicina da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA. Também foram utilizados os anticorpos conjugados anti-CD24-PE (MHCD2404) e anti-CD44-FITC (MHCD4401) da Molecular Probes – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA. Como controles de isotipo, foram utilizados os anticorpos IgG1-PE (SC-2866) e IgG2b-FITC (SC-2857), ambos da Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA. O equipamento Spectramax M5 foi utilizado para a leitura de absorbâncias e os dados foram analisados pelo programa SoftMax Pro 5.2, ambos da Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, EUA. O citômetro de fluxo utilizado foi o BD FACSCalibur, BD Biosciences, Inc. e a análise de dados foi realizada no programa FlowJo v.5.2.7, Tree Star, Inc.

Nas análises por Western Blot, as proteínas foram extraídas com o tampão Triton Lysis Buffer e inibidor de protease da Boston Bioproducts, Chestnut St Ashland, MA, EUA. As proteínas foram quantificadas utilizando-se o Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA. Foram utilizados géis de acrilamida pré-prontos Amersham ECL™ Gel 4%-12%, 15 wells e membranas Amersham Hybond ECL™ da GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra. A revelação foi feita com a solução Amersham ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent e as

imagens foram adquiridas no equipamento Image Quant LAS 4000, ambos da GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra. A análise de densitometria de massa foi realizada no programa ImageJ do NIH, EUA.

Os anticorpos primários utilizados nas marcações para Western blot foram: anti-ADRP (10R-A117a) da Fitzgerald Industries International, Acton, MA, EUA; anti-PPAR- γ H-100 (SC-7196) da Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA; anti-NLRP3 (XA-1033) da ProSci, Loveland, CO, EUA; anti-PARP1 (abc26) da Millipore, Billerica, MA, EUA; anti-GAPDH (G8795) e anti- β actina (A5316) da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA. Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-coelho conjugado à HRP (NA934V) e anti-camundongo conjugado à HRP (NA931V), ambos da GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra.

Na marcação de fluorescência foi utilizado o kit CellROX™ Deep Red Reagent (C10422) da Molecular Probes – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA. Como marcador fluorescente nuclear, utilizou-se DAPI da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA. Na montagem da lâmina utilizou-se solução anti-decaimento de fluorescência, ProLong Gold da Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA. As imagens foram adquiridas no Microscópio Confocal de Varredura a Laser TCS-SP5 (Leica, Wetzlar, HE, Alemanha).

Para análises de microscopia de luz foram utilizados o Oil Red O (O0625) e 1,2 Propenodiol (388039) da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA. As imagens foram adquiridas no microscópio Axiophot Zeiss® pelo software AxioVision LE (Carl Zeiss AG, Alemanha).

O programa GraphPad Prism 5, GraphPad Software, Inc. foi utilizado para gerar o gráficos e análises estatísticas.

2.2. Cultivo Celular

No desenvolvimento do trabalho, foram utilizadas as linhagens celulares de câncer de próstata LNCaP clone FGC, obtida do banco de células do Rio de Janeiro, e DU145 cedida pelo Professor Dr. Sergio Verjovski do Departamento de Química da Universidade de São Paulo. As células LNCaP foram cultivadas em meio RPMI e as células DU145 em meio DMEM, ambos suplementados com 10%

de Soro Fetal Bovino (SFB) e 25 µg/ml de gentamicina. As células foram mantidas em estufa úmida com 5% de CO₂, a 37°C.

A linhagem DU145 foi isolada em janeiro de 1976 por Stone K. R. *et al.* As células foram retiradas de um foco de metástase encontrado no cérebro. O paciente de 69 anos apresentava estado avançado de câncer de próstata metastático, além de um histórico de três anos de leucemia linfocítica. No momento da necropsia foram encontradas metástases no pulmão, fígado, coluna vertebral, fêmur, nódulos linfáticos e cérebro. As células da linhagem são epiteliais e crescem como ilhas isoladas (STONE *et al.*, 1978). As células são consideradas andrógeno-independentes uma vez que não apresentam receptor de andrógeno e nem a 5α-redutase, enzima responsável pela transformação de testosterona em 5α-dihidrotestosterona e que, conseqüentemente, estimula o crescimento celular. O antígeno específico da próstata (PSA) não é expresso por essa linhagem (RUSSELL e KINGSLEY, 2003) e a população com fenótipo CD44⁺/CD24⁻ varia de 7% a 10% (HURT *et al.*, 2008).

A linhagem LNCaP foi isolada de uma metástase no linfonodo supraclavicular esquerdo de um paciente de 50 anos com diagnóstico de câncer de próstata metastático. (HURT *et al.*, 2008). Em cultura, essa linhagem não forma uma monocamada e as células se dividem formando aglomerados estratificados. As células da linhagem são andrógeno-sensíveis, pois possuem o receptor de andrógeno, apresentam expressão de 5α-redutase e de PSA (HOROSZEWICZ *et al.*, 1983). Além disso, a porcentagem de células LNCaP que apresentam o fenótipo CD44⁺/CD24⁻ é de apenas 0,04% (HURT *et al.*, 2008).

2.3. Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)

Para avaliar a influência de um microambiente inflamatório nas linhagens celulares de câncer de próstata, foi utilizado como modelo o sobrenadante condicionado de células mononucleares do sangue periférico. Foram selecionados doadores do sexo masculino com idade superior a 45 anos, faixa etária de risco para o desenvolvimento do câncer de próstata.

Para a obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), o sangue foi coletado em tubos a vácuo contendo EDTA e, em seguida, transferido para tubos de 50 ml. O Histopaque foi adicionado ao fundo dos tubos, de forma a gerar duas fases. A proporção de volume entre o sangue coletado e o Histopaque foi de 1:1. Os tubos foram centrifugados a 2500 r.p.m com aceleração 1 e desaceleração 0, por 35 minutos. Quatro fases foram formadas, a fase com aspecto de nuvem branca referente às células mononucleares, foi coletada com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro com ponta fina e transferida para outro tubo. Foi adicionado Tampão Fosfato Salina (PBS) para completar o volume final de 40ml. Os tubos foram então centrifugados a 1800 r.p.m. com aceleração e desaceleração 8, por 25 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em SFB, contadas e congeladas em solução de 10% DMSO em SFB. As células foram armazenadas em freezer a -80C°.

2.4. Estímulos

Para a análise do efeito de estímulos pró-inflamatórios nas linhagens de câncer de próstata DU145 e LNCaP, as células foram estimuladas com LPS (1µg/ml, *overnight*) ou a combinação de LPS (1µg/ml, *overnight*) e posteriormente, ATP (5mM, 1h), todos por 24h. Esses grupos experimentais foram denominados LPS e LPS + ATP, respectivamente.

Além disso, com o objetivo de avaliar a ação dos indutores inflamatórios sobre as células tumorais, foi realizada a análise dos efeitos do sobrenadante condicionado de PBMC sobre as células das linhagens DU145 e LNCaP. Para isso, as células de PBMC foram descongeladas e semeadas em uma proporção de 5:1 em relação ao número de células das linhagens de câncer de próstata, que varia de acordo com o experimento realizado. As células PBMC foram então estimuladas com LPS (1µg/ml, *overnight*) ou a combinação de LPS (1µg/ml, *overnight*) e depois ATP (5mM, 1h), por 24h. Como controle do meio condicionado, foi utilizado o sobrenadante de células PBMC não estimuladas. Os sobrenadantes condicionados do PBMC, após as 24h de tratamento, foram transferidos para cultura das linhagens celulares de câncer de próstata substituindo o meio de cultura de cada linhagem. 24h após a transferência dos sobrenadantes condicionados, as células das linhagens foram analisadas. Esses pontos experimentais foram denominados Sob. PBMC,

Sob. PBMC LPS e Sob. PBMC LPS + ATP. Na figura 4 é exemplificado com um esquema os tempos e estímulos descritos.

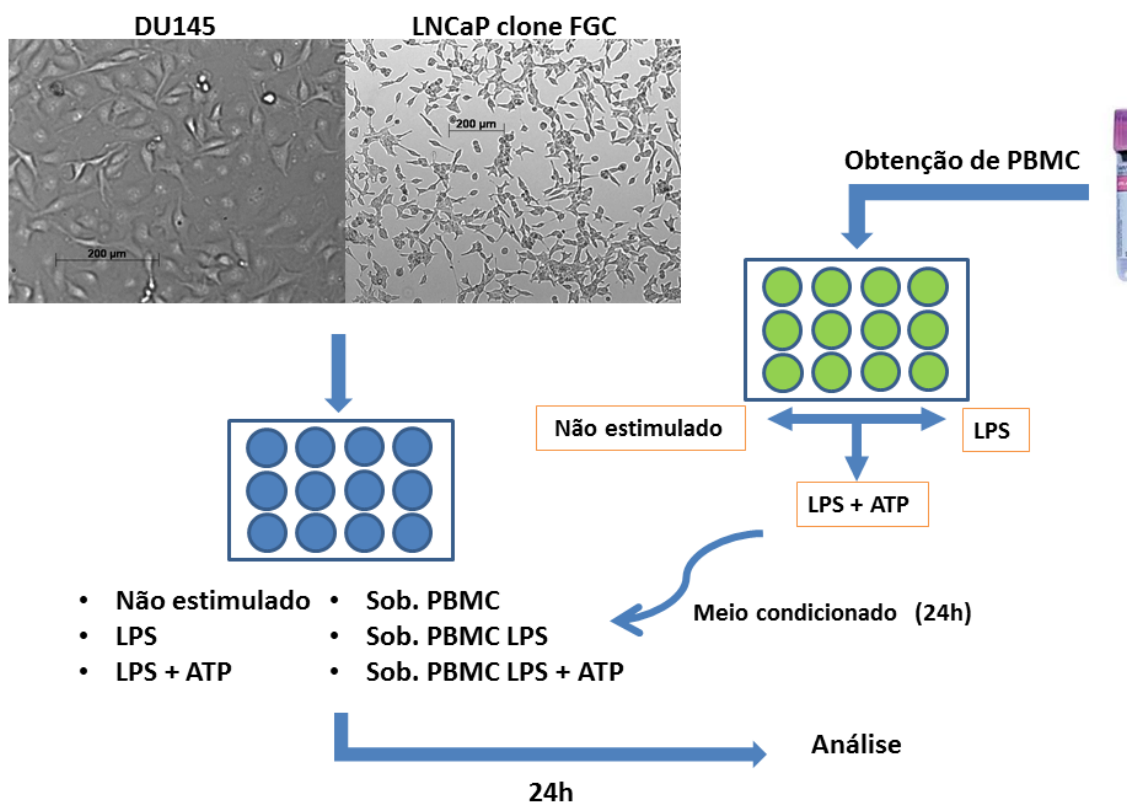


Figura 4. Esquema demonstrando os tempos e estímulos utilizados no desenvolvimento do trabalho.

2.5. Análise do Ciclo Celular e Fragmentação Nuclear por Iodeto de Propídeo

O Iodeto de Propídeo (PI) é uma molécula fluorescente e agente intercalante de DNA. Por isso, através da marcação com PI é possível determinar a quantidade de DNA presente nas células e, portanto determinar a fase do ciclo celular de acordo com o perfil de fluorescência obtido. Em um histograma de fluorescência pelo número de células observa-se: 1) células na fase G0/G1 (2n) formando o pico de menor intensidade, 2) células na fase S formando um pico intermediário que representa a transição de 2n para 4n e 3) células na fase G2/M (4n) sendo este o pico de maior intensidade de fluorescência. Células que apresentam fragmentação nuclear formam um pico anterior às células em G0/G1,

denominado sub-G1, uma vez que a emissão de fluorescência dos fragmentos do material genético é menor do que a observada no material intacto (2n).

As células de linhagem de câncer de próstata, LNCaP e DU145 foram adicionadas às placas de 12 poços, em uma quantidade de 1×10^5 e 8×10^4 células por poço, respectivamente. Após 24 horas de estímulos, as células foram coletadas em tubos tipo eppendorf e centrifugadas por 5 min, a 400g. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 1ml de PBS e centrifugadas novamente por 5 min, a 400g. Depois de lavadas, as células foram fixadas em 1ml etanol 70% por pelo menos 2 horas, a 4°C. Uma lavagem em PBS foi realizada após a fixação e então as células foram ressuspensas em 1ml de solução de PI (0,1% Triton X-100, PI (10µg/ml) e 200µg/ml de RNase livre de DNase em PBS) e incubadas por 10 min, a 37°C, com proteção da luz. Ao fim da incubação as células foram centrifugadas por 5 min, a 400g. O sobrenadante da solução de PI foi descartado, as células ressuspensas em PBS 1x e levadas para análise por citometria de fluxo.

No citômetro de fluxo foram adquiridos 10.000 eventos totais para cada grupo experimental. A leitura foi realizada no canal FL2A, em escala linear. As análises de ciclo celular foram realizadas na plataforma própria para ciclo celular do programa FlowJo.

2.6. Avaliação do fenótipo CD44/CD24

A população de células tronco tumorais nas linhagens celulares de próstata DU145 e LNCaP foi determinada utilizando o fenótipo CD44⁺/CD24⁻.

As células de linhagem de câncer de próstata, LNCaP e DU145 foram adicionadas às placas de 12 poços, em quantidades de 1×10^5 e 8×10^4 células por poço, respectivamente. Após as 24 horas de estímulos, as células foram coletadas em tubos tipo eppendorf e centrifugadas por 5 min, a 400g. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 1ml de 2% BSA em PBS e centrifugadas novamente por 5 min, a 400g. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 50µl de 2% BSA em PBS com os anticorpos conjugados anti-CD44-FITC e anti-CD24-PE, ambos na diluição de 1:20. As células foram incubadas com os anticorpos por 30 minutos, a 4°C e protegidas da luz. Após o período de incubação as células foram centrifugadas por 5

min, a 400g. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas mais uma vez com 2% BSA em PBS e levadas para análise em citômetro de fluxo.

No citômetro de fluxo foi determinado um *gate*, dentro do qual foram adquiridos 10.000 eventos nos canais FL1H e FL2H. Como controles negativos foram utilizados os isotipos de cada anticorpo. Para a compensação e controles positivos foram utilizadas células de PBMC marcadas com os anticorpos em conjunto ou separadamente.

2.7. Avaliação da proliferação celular por marcação com CFSE

CFSE é um marcador celular que entra passivamente nas células. Esterases intracelulares clivam o grupo acetato do CFSE tornando a molécula fluorescente. Após a clivagem, o grupo succinimidil ester forma conjugados fluorescentes com aminas presentes no citoplasma, que ficam estáveis durante longos períodos. Quando ocorre a divisão celular tais conjugados são divididos igualmente entre as células-filhas. Sendo assim, é possível acompanhar as divisões de uma população de células ao longo de um período.

Para determinar a proliferação celular, as células foram marcadas no momento do plaqueamento. Um total de 1×10^6 células de ambas as linhagens, LNCaP e DU145, foram ressuspensas em 1ml de SFB em um tubo de 15ml. Adicionou-se a cada tubo 1ml de CFSE em PBS para uma concentração final de CFSE de $5 \mu\text{M}$ e a partir desse momento as células foram protegidas da luz até o momento da análise. As células foram incubadas por 10 minutos, a 37°C . Durante o período de incubação os tubos foram levemente agitados a cada 2 minutos. Depois da incubação foi adicionado 1ml de SFB gelado e os tubos foram deixadas no gelo por 5 minutos. Os tubos foram então completados até 10 ml com meio suplementado e gelado, RPMI ou DMEM dependendo da linhagem, e centrifugados por 10 minutos a 300g. O sobrenadante foi descartado e essa etapa foi repetida por mais duas vezes. Depois, as células foram adicionadas à placas de 12 poços em uma quantidade de 1×10^5 células LNCaP e 8×10^4 células DU145. Após 24h de estímulo a análise foi realizada por citometria de fluxo. Como controle da população que não dividiu foram utilizadas células tratadas com $10 \mu\text{M}$ de colchicina durante 1 hora e mantidas em cultura até o fim do experimento.

No citômetro de fluxo, após a determinação do *gate*, 10.000 eventos foram adquiridos no canal FL1H. As análises foram feitas comparando a amostra tratada com colchicina, que não entrou em divisão, e as demais amostras na plataforma de proliferação celular do programa FlowJo.

2.8. Ensaio de ELISA

Ensaio de ELISA foram realizados para quantificar a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α . As células LNCaP e DU145 foram adicionadas à placas de 24 poços em quantidades de 5×10^4 e 3×10^4 células por poço, respectivamente. Após os estímulos inflamatórios o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C . A quantificação foi feita de acordo com as recomendações do fabricante.

2.9. Western Blot

A presença das proteínas PPAR- γ , PARP1, e NLRP3 no lisado proteico das linhagens LNCaP e DU145 foi avaliada por Western Blot. As proteínas GAPDH e β -actina foram utilizadas com controles internos.

As células LNCaP e DU145 foram adicionadas à placas de 6 poços em quantidades de 5×10^5 e 3×10^5 células por poço, respectivamente. Após os estímulos as células foram lisadas com 60 μ l de Tampão Triton Lysis Buffer (Tris-HCL 50mM pH7,4; NaCl 150mM; EDTA 5mM e Triton X 100 1%) com inibidor de protease, diretamente no poço, com o auxílio de um rodinho. As amostras foram coletadas em tubos tipo eppendorf e incubadas no gelo por 30 min. A cada 5 min as amostras foram agitadas em agitador tipo vortex. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 5 min, a 3000 r.p.m e os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos. As amostras de proteínas totais foram armazenadas a -20°C e quantificadas utilizando-se o kit Bicinchoninic Acid Protein Assay de acordo com as recomendações do fabricante.

No gel de acrilamida pré-pronto de gradiente entre 4%-12%, foram aplicados 20 μ g de proteínas totais de cada amostra. Antes de serem aplicadas, as

proteínas foram fervidas por 5 min. A corrida do gel foi realizada a 160V por 1 hora, utilizando-se o tampão Tris-Glicina (25mM Tris; 250mM Glicina; 1% SDS – pH 8,2).

Para o Western Blot, o gel foi transferido para a membrana de nitrocelulose, com tampão de transferência (24mM Tris, 193mM Glicina, 20% Metanol) pelo sistema *semi-dry* por 45 minutos, a 15V. A membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio (5% leite desnatado Molico e 0,05% Tween-20 em PBS) por 1 hora em agitação, a temperatura ambiente. Em seguida, os anticorpos primários foram diluídos em tampão de bloqueio nas seguintes diluições 1:1.000 anti-NLRP3; 1:10.000 anti-PARP1; 1:500 anti-PPAR- γ ; 1:20.000 anti-GAPDH e 1:20.000 anti- β -actina e incubados com a membrana *overnight*, a 4°C. Depois, as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos em 0,05% Tween-20 em PBS e incubadas com os anticorpos secundários conjugados à HRP diluídos 1:5.000 em solução de bloqueio por 1 hora sob agitação, à temperatura ambiente.

Após a incubação com anticorpo secundário as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos em 0,05% Tween-20 em PBS e reveladas utilizando 1ml de cada solução do kit Amershan ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent, por 5 minutos.

2.10. Marcação intracelular de PPAR- γ

As células LNCaP e DU145 foram adicionadas à placas de 12 poços em quantidades de 1×10^5 e 8×10^4 células por poço, respectivamente. Após 24 horas de estímulo as células foram transferidas para tubos tipo *ependorf* e centrifugadas por 5 min, a 300g. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 1ml de PBS, e novamente centrifugadas por 5 min, a 300g. Após a lavagem e o descarte do sobrenadante, as células foram fixadas em 100 μ l de formaldeído 3,7% por 10 min, à temperatura ambiente. Depois de fixadas as células foram centrifugadas por 5 min, a 300g e lavadas em 150 μ l de PBS. Após a lavagem, o pellet foi ressuspensado em 150 μ l de tampão de permeabilização (0,5% de Saponina em PBS) e incubados por 15 min, a temperatura ambiente. Os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos, a 300g e lavados em 150 μ l de tampão de permeabilização. Essa etapa foi repetida mais duas vezes. As células foram então

ressuspendidas e incubadas no escuro com o anticorpo primário de PPAR- γ conjugado a FITC diluído 1:200 em 50 μ l tampão de permeabilização, por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação as células foram novamente lavadas por três vezes em 150 μ l de tampão de permeabilização. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspendidas em 800 μ l de PBS e levadas para análise por citometria de fluxo.

No citômetro de fluxo, após a determinação do *gate*, 10.000 eventos foram adquiridos no canal FL1H. Como controle, as células foram marcadas com o isotipo do anticorpo conjugado a FITC.

2.11. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por microscopia confocal

As células LNCaP e DU145 foram adicionadas à placas de 24 poços contendo lamínulas de microscopia no fundo dos poços, em quantidades de 5×10^4 e 3×10^4 células por poço, respectivamente. Após as 24h de estimulação, o reagente CellRoxTM Deep Red foi adicionado ao meio de cultura a uma concentração final de 5 μ M e as células foram incubadas por 30 min a 37°C. Após a incubação o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados três vezes com 500 μ l PBS 1x por 5 min. As células foram fixadas com 200 μ l de formaldeído 3,7% por 15 min. Outras três lavagens de 5 min. com 500 μ l de PBS 1x foram feitas após a fixação. Para a marcação do núcleo, as células foram incubadas com 200 μ l de DAPI 300nM por 7 min, à temperatura ambiente. Os poços foram lavados mais três vezes com 500 μ l PBS 1x por 5 min.

As lamínulas foram montadas utilizando o meio de montagem anti-decaimento de fluorescência ProLong Gold e armazenadas em freezer -20°C. A análise foi feita em microscópio confocal de varredura a laser.

2.12. Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram feitas com teste ANOVA e pós-teste Bonferroni ou Dunnet. Foram considerados significativos os valores de *p* menores que 0,05%.

3. RESULTADOS

3.1. Análise da secreção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , pelas linhagens DU145 e LNCaP após estímulo pró-inflamatório.

IL-1 β , IL-6 e TNF- α são citocinas secretadas mediante um estímulo pró-inflamatório. A secreção dessas citocinas pelas linhagens tumorais de próstata DU145 e LNCaP foi avaliada 24h após estímulo inflamatório.

As citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α não foram detectadas em ambas as linhagens de câncer de próstata após estímulo inflamatório direto. Entretanto, elas foram observadas após os estímulos com os sobrenadantes de PBMC tratados com LPS e/ou LPS + ATP, como pode ser observado na Figura 5. Como controles dos experimentos, foram quantificados também os sobrenadantes do PBMC tratado ou não tratado e que não foram transferidos para as células, permanecendo em cultura até o fim do experimento. Sendo assim, os níveis de citocina encontrados nos sobrenadantes das células das linhagens celulares de câncer de próstata após os estímulos inflamatórios foram comparados com os níveis de citocinas secretadas pelas células de PBMC. A comparação foi realizada para verificar o nível de secreção que se refere apenas às células de câncer de próstata.

O cultivo das células de câncer de próstata na presença do sobrenadante de PBMC tratado com LPS induziu um aumento significativo de secreção de IL-1 β em ambas as linhagens (Figura 5A e 5D). Apenas a linhagem DU145 estimulada com o sobrenadante de PBMC tratado com LPS + ATP apresentou níveis significativos de secreção de IL-1 β (Figura 5A). Em nenhuma das linhagens celulares houve indução de secreção de IL-1 β quando estimuladas com LPS apenas ou LPS + ATP. As células DU145 apresentaram uma maior secreção de IL-1 β quando comparadas com as células LNCaP e essa diferença foi significativa para todos os pontos em que a presença de IL-1 β foi detectada.

De forma similar, a secreção de IL-6 não foi induzida com a estimulação das linhagens DU145 e LNCaP com LPS ou LPS + ATP (Figura 5B e 5E). No entanto, embora os níveis de IL-6 detectados nas linhagens DU145 e LNCaP tenham sido similares quando as células foram cultivadas com sobrenadante de PBMC, apenas a linhagem DU145 quando estimulada pelo sobrenadante de PBMC tratado com LPS apresentou um aumento

significativo de secreção de IL-6 em relação ao nível basal no sobrenadante do PBMC (Figura 5B e 5E).

As células DU145 e LNCaP não apresentaram indução de secreção de TNF- α quando estimuladas com LPS ou LPS + ATP (Figura 5C e 5F). Da mesma forma, não pode ser detectado a secreção de TNF- α nas células do câncer de próstata DU145 e LNCaP estimuladas com os sobrenadantes de PBMC tratados ou não com LPS ou LPS + APT. (Figura 5C e 5F).

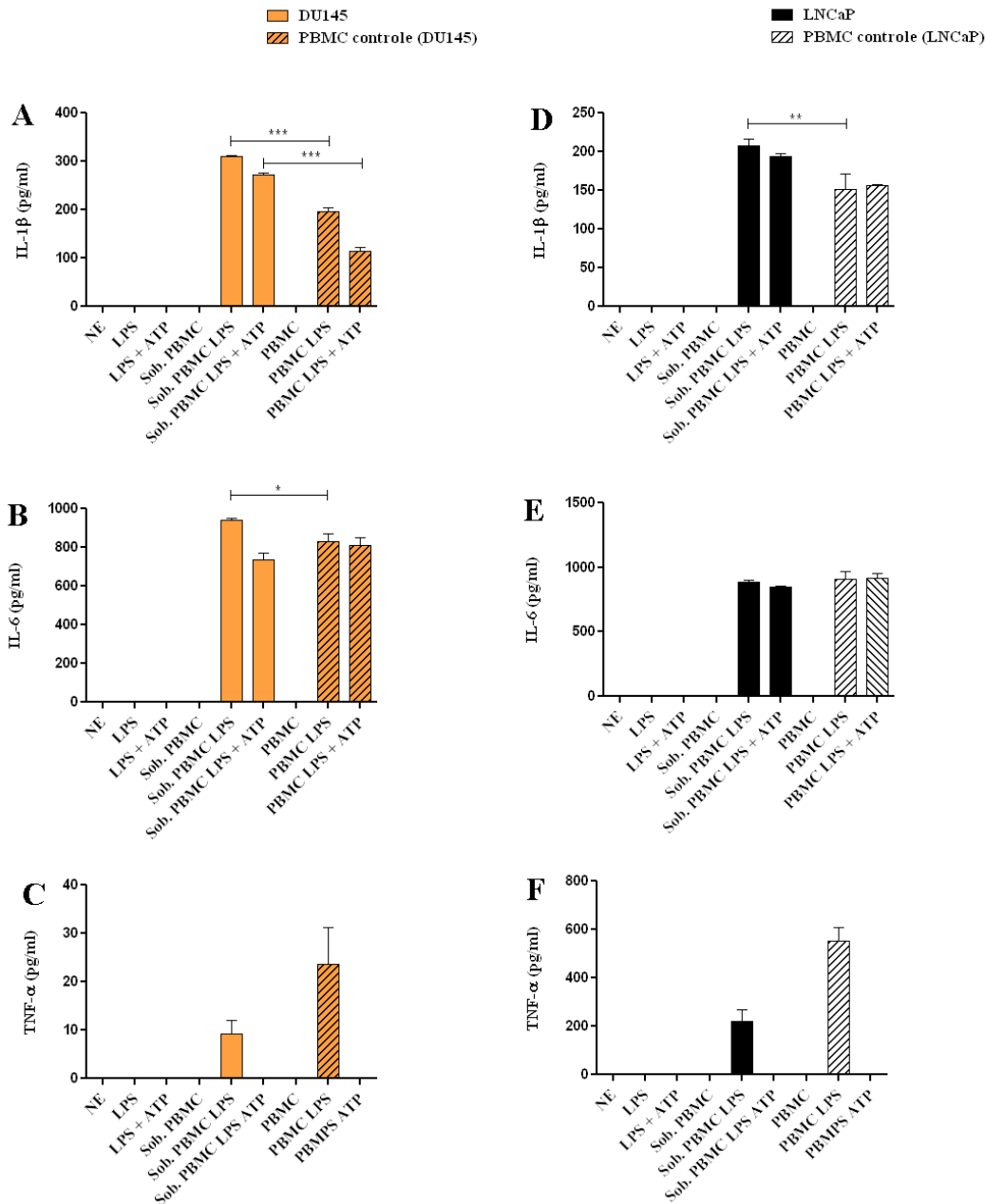


Figura 5. Análise da secreção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α pelas linhagens DU145 e LNCaP após estímulo pró-inflamatório. Níveis de secreção das citocinas IL-1 β (A e D), IL-6 (B e E) e TNF- α (C e F) pelas linhagens DU145 (A, B e C) e LNCaP (D, E e F), não estimuladas (NE) ou após estímulo pró-inflamatório: LPS (1 μ g/ml, *overnight*); LPS (1 μ g/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h); Sobrenadante de PBMC; Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1 μ g/ml, *overnight*) e Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1 μ g/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h). Os pontos PBMC, PBMC LPS e PBMC LPS + ATP foram dosados diretamente da cultura de PBMC. A quantificação foi realizada por ensaio de ELISA com sobrenadantes coletados 24h após a adição dos estímulos inflamatórios à cultura de DU145 e LNCaP. Gráficos de experimentos em triplicata, representativos de três repetições experimentais; concentração demonstrada em pg/ml. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA, Pós-teste Bonferroni. *P<0,05, **P<0,005, *** P<0,0005.

3.2. Avaliação do ciclo celular das linhagens tumorais de próstata DU145 e LNCaP após estímulo pró-inflamatório.

Células tumorais apresentam uma taxa de divisão acelerada decorrente de uma desregulação nas vias de controle do ciclo celular. Para avaliar a influência do microambiente inflamatório nesse processo, as alterações no ciclo celular das linhagens de câncer de próstata DU145 e LNCaP foram analisadas na presença e ausência de estímulos inflamatórios.

As células DU145 apresentaram uma porcentagem similar de células nas três fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2) após estímulos inflamatórios (Figura 6A). No entanto, as amostras tratadas com o sobrenadante de PBMC estimulado com LPS + ATP apresentaram uma diminuição significativa na porcentagem de células em G0/G1 e consequente aumento na porcentagem de células na fase S (Figura 6A).

Após o estímulo inflamatório, as células LNCaP, quando comparadas às células não estimuladas, não apresentaram nenhuma mudança significativa na porcentagem de células observadas em cada fase do ciclo celular (Figura 6B). No entanto, notou-se uma diminuição na fase S e aumento na fase G0/G1 nos pontos estimulados com LPS, Sob. PBMC e Sob. PBMC LPS. Por outro lado, o ponto estimulado com Sob. PBMC tratado LPS + ATP apresenta uma diminuição na fase G0/G1 e aumento na fase S. Apesar da identificação destas pequenas variações, nenhuma delas apresentou significância estatística.

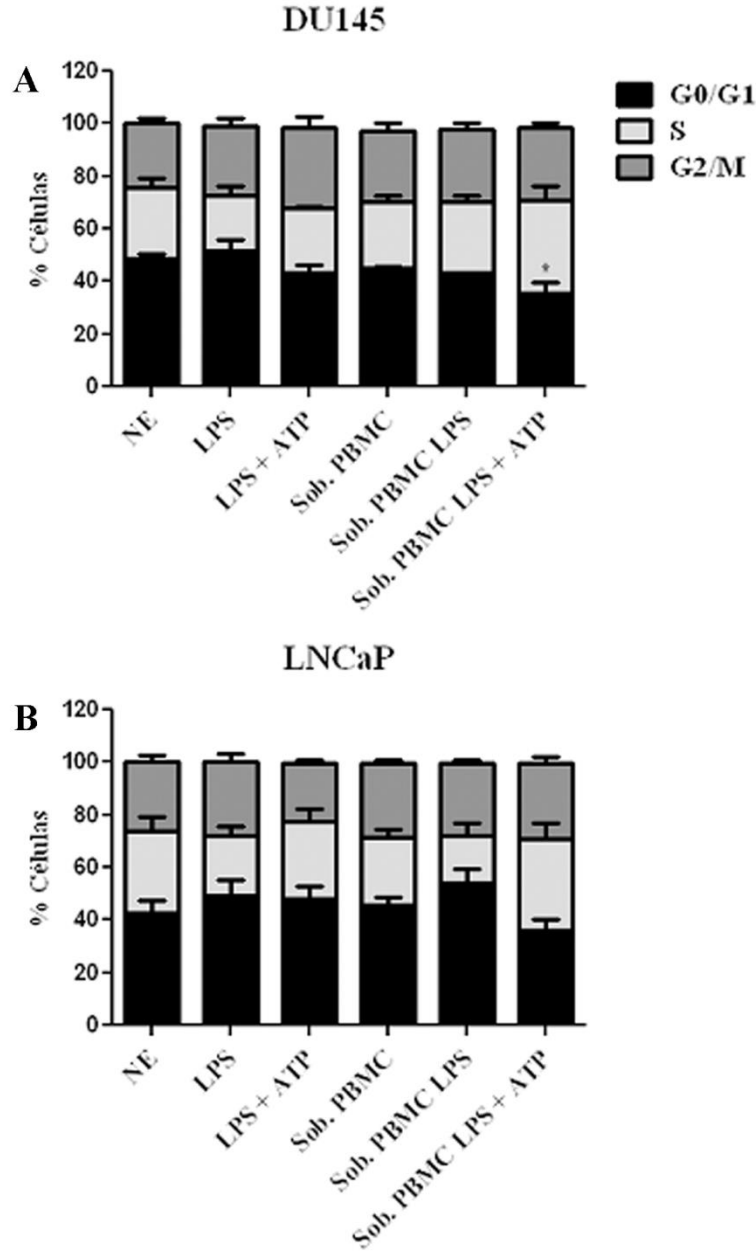


Figura 6. Avaliação do ciclo celular das linhagens tumorais de próstata DU145 e LNCaP após estímulo pró-inflamatório. As linhagens de câncer de próstata DU145 (A) e LNCaP (B), 24h após serem estimuladas ou não estimuladas, foram avaliadas por marcação com PI em citometria de fluxo quanto à porcentagem de células nas fases do ciclo celular G0/G1, S e G2. Os estímulos utilizados foram: LPS (1µg/ml, *overnight*); LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h); Sobrenadante de PBMC; Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) e Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h). As análises foram realizadas na plataforma de ciclo celular do programa FlowJo. Gráficos representativos de três experimentos independentes em monoplicata. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA, pós-teste Bonferroni, *P<0,05.

3.3. Estímulos pró-inflamatórios levam à fragmentação nuclear nas células das linhagens de câncer de próstata DU145 e LNCaP.

A fragmentação nuclear é um fenômeno que ocorre durante o processo de morte celular por apoptose ou piroptose. Células das linhagens LNCaP e DU145 foram avaliadas quanto à fragmentação nuclear após estímulo inflamatório.

Todos os estímulos inflamatórios levaram à fragmentação nuclear nas células DU145 e LNCaP (Figura 7). No entanto, apenas as células tratadas com sobrenadante de PBMC estimulados com LPS e LPS + ATP levaram a uma porcentagem significativa de fragmentação nuclear em células LNCaP enquanto em células DU145, a porcentagem de fragmentação nuclear só foi significativa quando as células foram estimuladas com o meio de PBMC tratado com LPS + ATP.

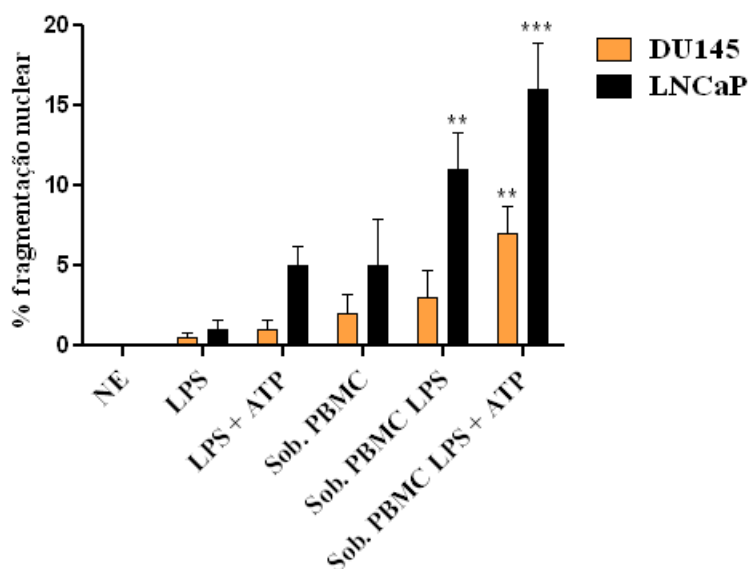


Figura 7. Estímulos pró-inflamatórios levam à fragmentação nuclear nas células das linhagens de câncer de próstata DU145 e LNCaP. Avaliação da fragmentação nuclear por marcação com PI em citometria de fluxo, nas células DU145 e LNCaP não estimuladas (NE) ou após os estímulo pró-inflamatórios LPS (1µg/ml, *overnight*); LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h); Sobrenadante de PBMC; Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) e Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h). As análises foram realizadas 24h após estímulo. Os dados foram normalizados a partir das células não estimuladas. Gráfico referente a três experimentos independentes, em monoplicata. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA, pós-teste Dunnet, ** P<0,005 *** P<0,0005.

3.4. Estímulo inflamatório leva à diminuição da proliferação celular nas células da linhagem de câncer de próstata LNCaP mas não na linhagem DU145.

Por meio da marcação intracelular com CFSE e análise da porcentagem de células progenitoras, foram avaliados os efeitos na proliferação celular das células DU145 e LNCaP após 24h de estímulo inflamatório.

As células DU145 não apresentaram nenhuma mudança na proliferação celular após estímulo inflamatório (Figura 8A). Após 24h de estímulo, observa-se quase 100% de células progenitoras no ponto não estimulado, indicando que toda a população inicial de células já sofreu divisão. Essa ocorrência também é observada nas células que receberam o estímulo.

Em contraste, as células LNCaP apresentaram uma pequena mas significativa diminuição da proliferação celular após todos os estímulos inflamatórios utilizados (Figura 8B), quando comparados com a porcentagem de células progenitoras das células não estimuladas. Após 24h, observa-se aproximadamente 70% de células progenitoras no controle não estimulado e cerca de 55% de células progenitoras após os estímulos inflamatórios, indicando uma diminuição de 15% na proliferação celular.

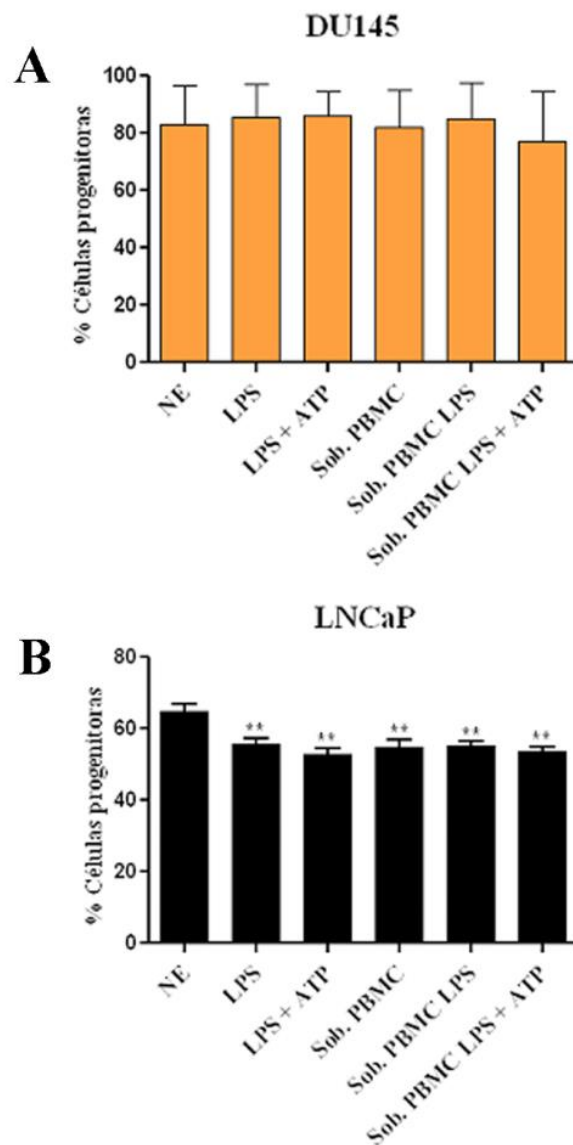


Figura 8. Estímulo inflamatório leva à diminuição da proliferação celular nas células da linhagem de câncer de próstata LNCaP, mas não na linhagem DU145. A porcentagem de células progenitoras nas linhagens DU145 (A) e LNCaP (B) foi avaliada após 24h de estímulo inflamatório por meio de marcação com CFSE por citometria de fluxo, sendo estes, o LPS (1µg/ml, *overnight*); LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h); Sobrenadante de PBMC; Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) e Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h). As análises foram realizadas na plataforma de proliferação celular do programa FlowJo. Gráficos representativos de três experimentos independentes em monoplicata. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA, pós-teste Dunnet, ** P<0,005.

3.5. Expressão das proteínas NLRP3, PPAR- γ , PARP1 clivada nas células das linhagens de câncer de próstata DU145 e LNCaP.

A expressão da proteína PPAR- γ nas células DU145 e LNCaP foi analisada, por citometria de fluxo, após estímulo inflamatório por meio de marcação intracelular com anticorpos conjugados fluorescentes. Em ambas as linhagens celulares, foram observadas pequenas variações na expressão da proteína PPAR- γ após estímulo inflamatório (Figura 9). Especialmente no ponto LPS + ATP, onde houve uma tendência ao aumento de expressão de PPAR- γ nas células LNCaP, e no ponto Sob. PBMC LPS + ATP, em que a DU145 indicou uma diminuição na expressão dessa proteína. No entanto, quando comparadas com as células não estimuladas, essas variações não foram significativas.

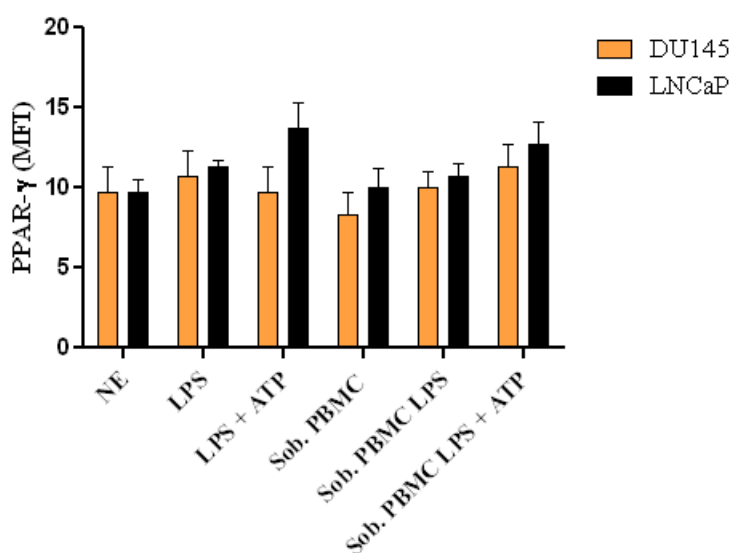


Figura 9. Expressão de PPAR- γ nas linhagens de câncer de próstata DU145 e LNCaP após estímulo inflamatório. As células DU145 e LNCaP foram marcadas com anticorpo anti- PPAR- γ conjugado a FITC e analisadas por citometria de fluxo, após 24h de estímulo inflamatório. Os estímulos utilizados foram: o LPS (1 μ g/ml, *overnight*); LPS (1 μ g/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h); Sobrenadante de PBMC; Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1 μ g/ml, *overnight*) e Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1 μ g/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h). O gráfico apresenta as médias de intensidade de fluorescência (MFI) detectadas para cada ponto de estímulo em ambas as linhagens. Gráficos representativos de três experimentos independentes em monocultura. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA, pós-teste Dunnet.

A expressão das proteínas NLRP3, PPAR- γ e PARP1 clivada foi avaliada após estímulos inflamatórios por meio de Western Blot. Os dados foram mensurados por densitometria para obtenção dos índices quantitativos.

Uma vez que foi observada a secreção da citocina IL-1 β , verificou-se a expressão do receptor NLRP3, o qual participa da maturação e secreção dessa proteína, e que é estimulada por agonistas como LPS + ATP. As células DU145 apresentam uma expressão basal dessa proteína e quando estimuladas diretamente com LPS, exibiram uma expressão de 0,95 vezes, e de 0,88 vezes quando estimuladas com LPS + ATP, quando comparadas às células não estimuladas. As células tratadas indiretamente com o sobrenadante de PBMC estimulado apresentaram um aumento na expressão de NLRP3. As células tratadas com Sob. PBMC exibiram um aumento na expressão de NLRP3 de 1,51 vezes, enquanto as estimuladas com Sob. PBMC LPS e Sob. LPS + ATP aumentaram em 1,2 e 3,46 vezes, respectivamente (Figura 10). As células LNCaP apresentaram um aumento mais significativo na expressão de NLRP3 após estímulo direto com LPS + ATP e com o Sob. PBMC LPS correspondendo a 3,72 e 2,38 vezes respectivamente. No entanto, quando estimuladas diretamente com LPS apresentaram um aumento de 1,38 vezes e após estímulo com Sob. PBMC LPS + ATP um aumento de 1,37 vezes. Apenas quando estimuladas com Sob. PBMC as células LNCaP apresentaram uma discreta diminuição de 0,94 vezes (Figura 11).

As células DU145 (Figura 10) apresentaram uma variação pequena na expressão de PPAR- γ após estímulo inflamatório quando comparadas às células não estimuladas. Após os estímulos LPS, LPS + ATP, Sob. PBMC e Sob. PBMC LPS observou-se uma diminuição na expressão de 0,94; 0,94; 0,74 e 0,91 vezes em relação às células não estimuladas, respectivamente. As células tratadas com Sob. PBMC LPS + ATP apresentaram um aumento de 1,11 vezes na expressão desta proteína. As células LNCaP apresentaram uma variação menos evidente na expressão de PPAR- γ de 1,02 vezes nas células estimuladas com LPS, 0,95 nas estimuladas com LPS + ATP, 0,98 Sob. PBMC, 0,95 Sob. PBMC LPS e 0,91 Sob. PBMC LPS + ATP em relação às não estimuladas (Figura 11).

A proteína PARP1, quando clivada, participa nas vias de morte celular por apoptose ou piroptose. Avaliou-se a clivagem dessa proteína após os estímulos inflamatórios,

comparando com a expressão observada nas células não estimuladas. As células DU145, quando estimuladas, apresentaram diferentes níveis de clivagem. As células estimuladas com LPS, LPS + ATP e Sob. PBMC apresentaram uma diminuição na clivagem de 0,49; 0,49 e 0,52 vezes, respectivamente. No entanto, observou-se um aumento na clivagem de PARP1 quando as células foram estimuladas com Sob. PBMC LPS e Sob. PBMC LPS + ATP, que correspondeu a 15,9 e 6,0 vezes, respectivamente (Figura 10). As células LNCaP apresentaram uma diminuição na clivagem de PARP1 quando estimuladas com LPS, Sob. PBMC e Sob. PBMC LPS + ATP, correspondendo a 0,44; 0,37 e 0,77 vezes, respectivamente. Observou-se aumento na clivagem de PARP1 nas células LNCaP de 1,34 vezes após estímulo com LPS + ATP e de 1,22 vezes após estímulo com Sob. PBMC LPS (Figura 11).

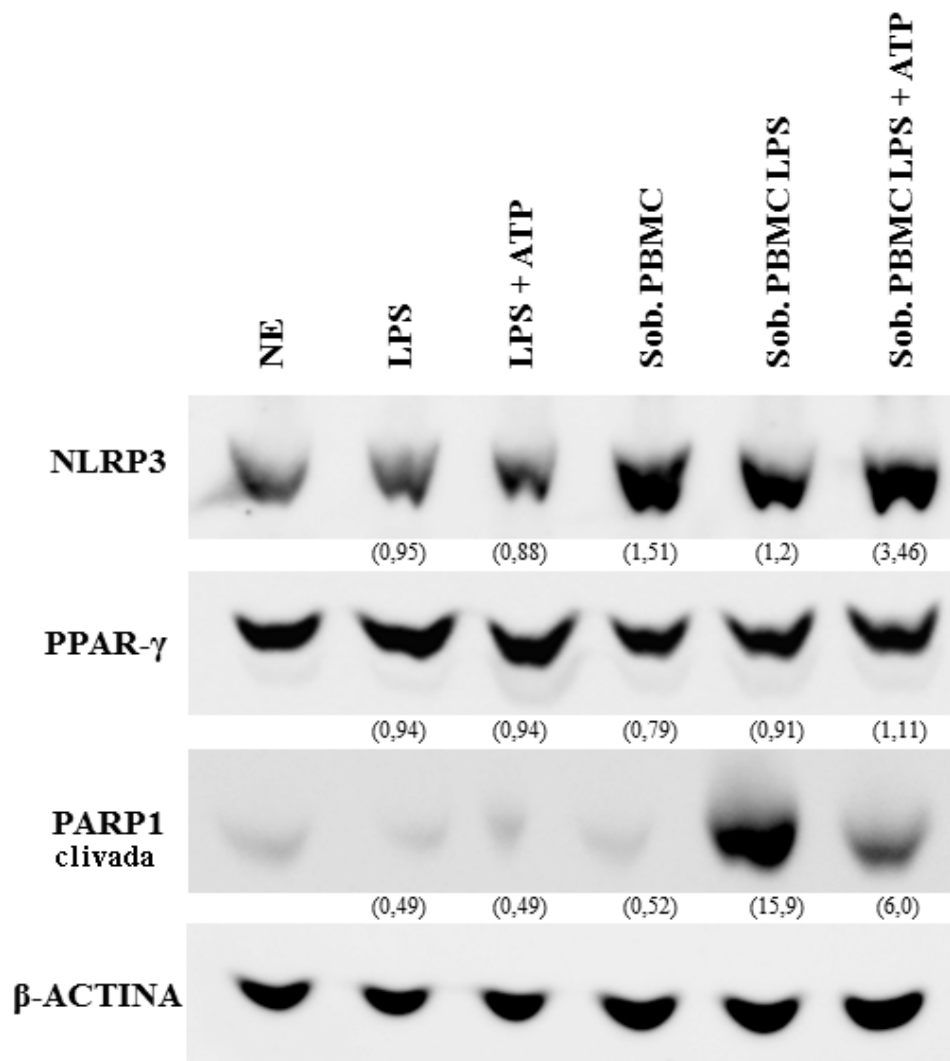


Figura 10. Expressão das proteínas NLRP3, PPAR- γ e PARP1 clivada nas células da linhagem DU145. Western blot dos lisados proteicos das células DU145 não estimuladas (NE) ou após os estímulos LPS (1 μ g/ml, *overnight*); LPS (1 μ g/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h); Sobrenadante de PBMC; Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1 μ g/ml, *overnight*) e Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1 μ g/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h). Marcações das proteínas NLRP3 (118kDa), PPAR- γ (54kDa), PARP1 (89kDa) e a β -actina (42kDa) que foi utilizada como controle endógeno. As bandas foram normalizadas com as do controle endógeno e depois comparadas com o controle não estimulado definido como 1,0.

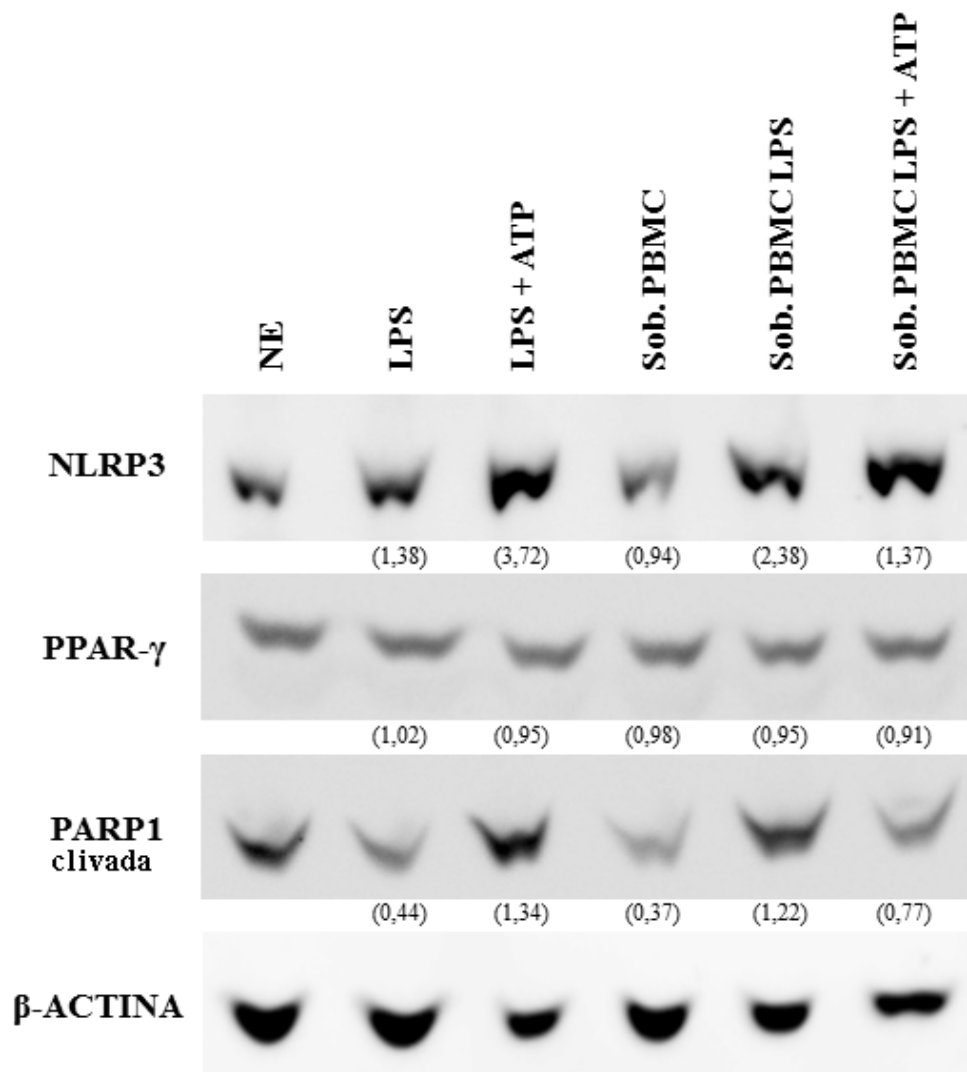


Figura 11. Expressão das proteínas NLRP3, PPAR- γ e PARP1 clivada nas células da linhagem LNCaP. Western blot dos lisados proteicos das células DU145 não estimuladas (NE) ou após os estímulos LPS (1 μ g/ml, *overnight*); LPS (1 μ g/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h); Sobrenadante de PBMC; Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1 μ g/ml, *overnight*) e Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1 μ g/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h). Marcações das proteínas NLRP3 (118kDa), PPAR- γ (54kDa), PARP1 (89kDa) e a β -actina (42kDa) que foi utilizada como controle endógeno. As bandas foram normalizadas com as do controle endógeno e depois comparadas com o controle não estimulado definido como 1,0.

3.6. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio nas linhagens DU145 e LNCaP após estímulo inflamatório.

A liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi avaliada por meio de marcação de fluorescência com o objetivo de verificar se o estímulo inflamatório modula esse processo.

As células DU145, mesmo sem receber estímulo algum, já apresentam espécies reativas de oxigênio em níveis basais (Figura 12). No entanto, quando são estimuladas com LPS, LPS + ATP, Sob. PBMC com LPS e Sob. PBMC LPS + ATP, observa-se um aumento nas espécies reativas de oxigênio liberadas no citoplasma. Esse aumento não é observado quando as células são estimuladas com o Sob. PBMC e os níveis permanecem bem similares aos observados nas células não estimuladas (Figura 12).

Assim como as células DU145, as células LNCaP não estimuladas também apresentaram espécies reativas de oxigênio basais (Figura 13). Os estímulos LPS, Sob. PBMC, Sob. PBMC LPS e Sob. PBMC LPS + ATP levaram a um aumento na liberação de espécies reativas de oxigênio. As células estimuladas com LPS + ATP, no entanto, apresentaram uma maior quantidade de ROS que as células não estimuladas, porém inferiores aos demais estímulos inflamatórios.

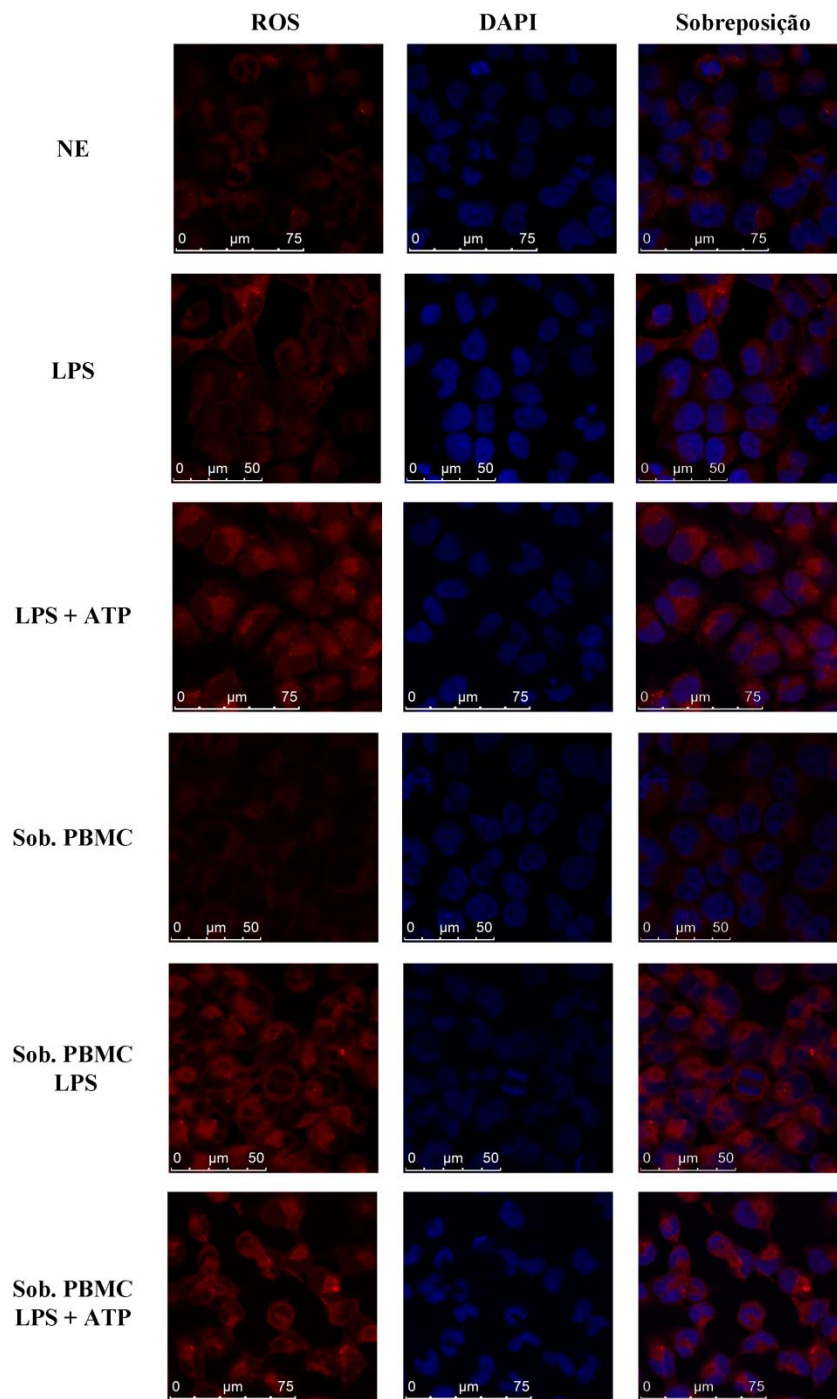


Figura 12. Avaliação de espécies reativas de oxigênio na linhagem DU145 após estímulo inflamatório. Células DU145 marcadas em vermelho indicam as espécies reativas de oxigênio (ROS) marcadas com CellROX na primeira coluna. Células marcadas com DAPI em azul indicam o núcleo na segunda coluna e na terceira coluna observa-se a sobreposição das imagens. Nas linhas, estão as imagens das células não estimuladas (NE) ou estimuladas com LPS (1µg/ml, *overnight*); LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h); Sobrenadante de PBMC; Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) e Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h). As análises foram feitas 24h após os estímulos.

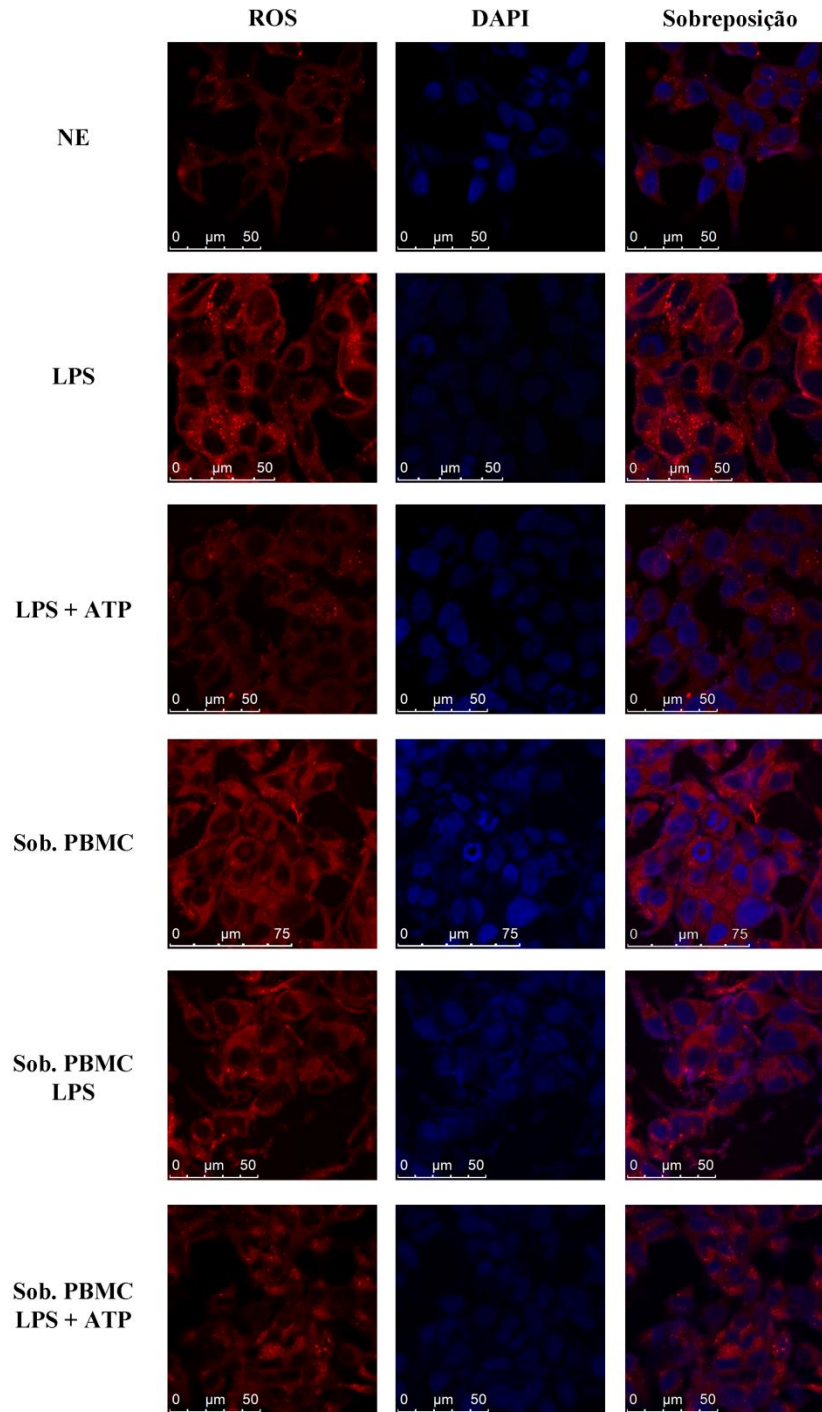


Figura 13. Avaliação de espécies reativas de oxigênio na linhagem LNCaP após estímulo inflamatório. Células LNCaP marcadas em vermelho indicam as espécies reativas de oxigênio (ROS) marcadas com CellROX na primeira coluna. Células marcadas com DAPI em azul indicam o núcleo na segunda coluna e na terceira coluna observa-se a sobreposição das imagens. Nas linhas, estão as imagens das células não estimuladas (NE) ou estimuladas com LPS (1 μ g/ml, *overnight*); LPS (1 μ g/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h); Sobrenadante de PBMC; Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1 μ g/ml, *overnight*) e Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1 μ g/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h). As análises foram feitas 24h após os estímulos.

3.7. Mudanças no fenótipo CD44/CD24 das linhagens DU145 e LNCaP após estímulo inflamatório.

Após 24h de estímulos inflamatórios, foi determinada a porcentagem de células para cada fenótipo CD44/CD24 nas linhagens celulares DU145 e LNCaP. O fenótipo CD44⁺/CD24⁻ é associado à população de células tronco tumorais.

As células DU145 não estimuladas apresentaram uma porcentagem média de 5% de células tronco tumorais (Tabela 1). Após o estímulo com LPS, a porcentagem de células CD44⁺/CD24⁻ se manteve em 5%, enquanto os estímulos LPS + ATP e Sob. PBMC levaram a um pequeno aumento para $7,0 \pm 0,333\%$ e $8,0 \pm 0,666\%$, respectivamente. No entanto, as células estimuladas com Sob. PBMC LPS e Sob. PBMC LPS + ATP apresentaram aumentos significativos na porcentagem de células tronco tumorais. As células estimuladas com Sob. PBMC LPS apresentaram $14,0 \pm 2,028\%$ de células CD44⁺/CD24⁻ e as células estimuladas com Sob. PBMC LPS + ATP apresentaram $11,0 \pm 1,202\%$ (Tabela 1).

Por outro lado, as células LNCaP não apresentaram níveis detectáveis de células tronco tumorais CD44⁺/CD24⁻ (Tabela 2). Após os estímulos pró-inflamatórios, não houve mudança na população de células tronco tumorais, que permaneceu nula. Entretanto, quando comparadas com as células não estimuladas, foram observadas modificações em outros tipos de fenótipo celular para estes mesmos marcadores. Foi identificado um aumento para $19,0 \pm 5,000\%$ na população de células com fenótipo CD44⁺/CD24⁺ e $11,0 \pm 1,000\%$ na população de células com fenótipo CD44⁻/CD24⁺, após o estímulo com LPS e ATP.

Tabela 1. Mudanças no fenótipo CD44/CD24 das células da linhagem DU145 após estímulo inflamatório.

DU145	CD44 ⁺ /CD24 ⁻	CD44 ⁺ /CD24 ⁺	CD44 ⁻ /CD24 ⁺	CD44 ⁻ /CD24 ⁻
NE	5,0 ± 0,577	1,0 ± 0,333	1,0 ± 0,333	93,0 ± 0,577
LPS	5,0 ± 0,000	1,0 ± 0,333	1,0 ± 0,333	93,0 ± 0,577
LPS + ATP	7,0 ± 0,333	1,0 ± 0,000	2,0 ± 0,577	90,0 ± 0,881
Sob. PBMC	8,0 ± 0,666	1,0 ± 0,000	1,0 ± 0,333	90,0 ± 0,881
Sob. PBMC LPS	14,0 ± 2,028***	1,0 ± 0,000	2,0 ± 0,333	84,0 ± 2,028
Sob. PBMC LPS + ATP	11,0 ± 1,202**	1,0 ± 0,000	1,0 ± 0,000	87,0 ± 1,202

Tabela mostrando a média ± erro padrão da porcentagem de células DU145 não estimuladas (NE) e estimuladas com LPS (1µg/ml, *overnight*); LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h); Sobrenadante de PBMC; Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) e Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h), para cada fenótipo CD44/CD24. Valores referentes a três experimentos independentes em monoplicata. ANOVA, pós-teste Dunnet, ** P<0,005 , *** P<0,0005.

Tabela 2. Mudanças no fenótipo CD44/CD24 das células da linhagem LNCaP após estímulo inflamatório.

LNCaP	CD44 ⁺ /CD24 ⁻	CD44 ⁺ /CD24 ⁺	CD44 ⁻ /CD24 ⁺	CD44 ⁻ /CD24 ⁻
NE	0,0 ± 0,000	0,5 ± 0,500	1,5 ± 0,500	98,0 ± 0,000
LPS	0,0 ± 0,000	0,5 ± 0,500	2,0 ± 0,000	97,5 ± 0,500
LPS + ATP	0,0 ± 0,000	19,0 ± 5,000**	11,0 ± 1,000**	70,0 ± 4,000
Sob. PBMC	0,0 ± 0,000	1,5 ± 0,500	3,5 ± 2,500	95,0 ± 3,000
Sob. PBMC LPS	0,0 ± 0,000	1,0 ± 0,000	4,0 ± 0,000	95,0 ± 0,000
Sob. PBMC LPS + ATP	0,0 ± 0,000	3,5 ± 2,500	5,5 ± 1,500	91,0 ± 4,000

Tabela mostrando a média ± erro padrão da porcentagem de células LNCaP não estimuladas (NE) e estimuladas com LPS (1µg/ml, *overnight*); LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h); Sobrenadante de PBMC; Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) e Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h), para cada fenótipo CD44/CD24. Valores referentes a dois experimentos independentes em monoplicata. ANOVA, pós-teste Dunnet, ** P<0,005.

4. DISCUSSÃO

A biologia tumoral não pode mais ser compreendida apenas pelo aspecto celular, o microambiente tumoral e as células que formam o estroma associado ao tumor atuam ativamente na tumorigênese, na manutenção do tumor e na metástase. E para se chegar a um entendimento mais amplo do câncer, todos estes elementos devem ser considerados conjuntamente (HANAHAN e WEINBERG, 2011; SCHIAVONI, GABRIELE e MATTEI, 2013). A inflamação é um componente do microambiente tumoral que está presente em quase todas as neoplasias, mesmo aquelas em que a transformação celular não está diretamente relacionada a um processo inflamatório inicial (MANTOVANI *et al.*, 2008). Independente de seu estímulo inicial, a inflamação pode desencadear dano celular e genômico, promovendo estímulo proliferativo e criando um microambiente rico em citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que estimulam a divisão celular, angiogênese e reparação tecidual (AMES, GOLD e WILLETT, 1995; HUSSAIN, HOFSETH e HARRIS, 2003; VIOLA *et al.*, 2012).

O câncer de próstata também está intimamente relacionado com a formação do microambiente inflamatório, uma vez que a próstata é um órgão extremamente susceptível a infecções (DE MARZO *et al.*, 2007; SFANOS e DE MARZO, 2012). Além disso, amostras histológicas de câncer de próstata exibem, frequentemente, lesões com infiltrados inflamatórios sem uma explicação aparente e essas lesões normalmente estão associadas a uma atrofia epitelial local com atividade proliferativa aumentada em relação ao epitélio normal, sendo assim denominada atrofia inflamatória proliferativa (DE MARZO *et al.*, 1999).

Embora a importância da inflamação no câncer de próstata esteja cada vez mais evidente, ainda se sabe pouco sobre a dinâmica entre o microambiente inflamatório tumoral e as células cancerígenas. Em nossas análises não foi identificada uma relação entre a ativação inflamatória direta sobre as células tumorais e a secreção de mediadores inflamatórios por estas células, sendo estes mediadores citocinas. Em ambas as linhagens estudadas, não foi detectada a secreção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α após estímulo inflamatório direto de LPS ou LPS + ATP. No entanto, é conhecido que ocorre alta expressão do receptor TLR4 nas células de câncer de próstata (GONZALEZ-REYES *et al.*,

2011), cujo ligante e ativador inflamatório é o LPS. Isso indica que pode haver algum problema na via de sinalização ativada por esse receptor. Em células de câncer de ovário que apresentam alta expressão de TLR4, não foi detectada a expressão da proteína MyD88 que participa da cascata de sinalização via TLR4 e é essencial para a sinalização pró-inflamatória, indicando que a via de sinalização não estava funcional (SZAJNIK *et al.*, 2009). Estudos similares demonstraram que linhagens de células de câncer colo retal também apresentavam alta expressão de TLR4, porém não apresentavam expressão de CD14, uma proteína auxiliar essencial ao complexo do receptor (SIMIANTONAKI *et al.*, 2007). Assim como nesses outros modelos cancerígenos, moléculas acessórias à via de sinalização por LPS podem não estar funcionais nas células de câncer de próstata LNCaP e DU145.

A ativação do inflamassoma NLRP3 através do estímulo direto de LPS + ATP também não levou a secreção da citocina IL-1 β em nenhuma das linhagens de câncer de próstata, embora nossos resultados tenham demonstrado um aumento na expressão proteica de NLRP3 após estímulo com LPS e LPS + ATP em células LNCaP. Esse caso pode indicar uma falha no processo de secreção de IL-1 β ou na montagem do próprio inflamassoma devido à ausência de sinais importantes para esta função no modelo celular estudado. A ativação do inflamassoma necessita de dois sinais, o primeiro sinal leva a expressão de NLRP3 e da pró-IL1 β e pró-IL18, o segundo sinal leva à montagem do complexo proteico e à consequente maturação das citocinas IL-1 β e IL-18. Em nossos ensaios o LPS atua como o primeiro sinal (SANZ e DI VIRGILIO, 2000; KAHLENBERG *et al.*, 2005) e o ATP é utilizado como segundo sinal para ativação do inflamassoma NLRP3 (MARIATHASAN *et al.*, 2006). Como foi observado, houve o aumento na expressão de NLRP3 após estímulo com LPS. No entanto, como não observamos a secreção de IL-1 β após o segundo sinal com ATP isso pode indicar que ocorre um ponto de interrupção na sinalização ou que nessas linhagens celulares o ATP não foi um sinal de perigo capaz de ativar o inflamassoma.

Quando as células de câncer de próstata receberam o estímulo inflamatório indireto por meio do sobrenadante de PBMC estimulados com LPS e LPS + ATP, foi detectado um aumento na quantidade de IL-1 β no sobrenadante, o que indica que, por estimulação indireta, houve a indução da secreção dessa citocina pelas células tumorais. Dessa forma,

embora a via de ativação direta do inflamassoma NLRP3 em células tumorais da próstata não tenha levado a secreção da sua citocina chave IL-1 β , essa secreção pode ser ativada por outros mediadores inflamatórios das células do sistema imune atuando de forma indireta. No contexto da doença, o refluxo de urina é considerado uma das causas da inflamação prostática e foi demonstrado que o ácido úrico pode agir como um sinal de perigo, levando à ativação do inflamassoma NLRP3 em células do sistema imune, resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias (MARTINON *et al.*, 2006) e contribuindo para a formação de um microambiente favorável à carcinogênese. Em contraste, células de câncer de próstata dependentes ou não de andrógeno, são capazes de induzir secreção de IL-1 β e IL-6 em células de PBMC, no entanto, essa secreção só ocorre quando há ligação célula-célula (SALMAN *et al.*, 2012).

A secreção de IL-6 foi observada apenas na linhagem andrógeno independente DU145 após estímulo com o sobrenadante de PBMC tratado com LPS. Amparando os resultados encontrados, sabemos que há atividade transcricional de IL-6 em células andrógeno independentes como a DU145 (TINDALL *et al.*, 2012) e já foi relatado também que células de câncer de próstata andrógeno independentes secretam mais IL-6 do que as células andrógeno sensíveis (CHUNG *et al.*, 1999).

Alta expressão de TNF- α em células de câncer de próstata tem sido correlacionada com aumento na proliferação celular, angiogênese, metástase e até mesmo com mudanças na resposta ao tratamento com agentes quimioterápicos (BOURAOUI *et al.*, 2008). No entanto, no modelo estudado não foi observada a secreção de TNF- α após as 24h de estímulo inflamatório nas linhagens DU145 e LNCaP. Em conjunto, esses dados reforçam a importância da relação entre o estroma tumoral e as células cancerígenas por meio da comunicação por mediadores inflamatórios.

Células LNCaP apresentaram uma diminuição na proliferação celular após estímulo inflamatório, enquanto as células DU145 não exibiram mudanças no perfil de proliferação celular. Já foi demonstrado que IL-1 β promove diminuição na proliferação celular das células LNCaP (ABDUL e HOOSEIN, 2000; BOURAOUI *et al.*, 2008). Também já foi demonstrada uma diminuição na proliferação de células andrógeno sensíveis, promovida pela secreção de IL-1 β por monócitos, além de uma redução nos níveis de PSA e de AR (CULIG *et al.*, 1998). Bouraoui e colaboradores (2008) demonstraram que IL-1 β promove

diminuição na proliferação mediante superexpressão de NF- κ B (p65), e esta supressão é dose dependente. Em contraste, já foi demonstrado que IL-6 pode levar a um aumento de proliferação celular nas células de câncer de próstata LNCaP e DU145 (DE MARZO *et al.*, 1999; DE MARZO *et al.*, 2007). Embora mudanças na proliferação celular tenham sido observadas, não houve mudanças significativas nas fases do ciclo celular das células LNCaP. As células DU145 apresentaram uma retenção na fase S quando estimuladas com o sobrenadante de PBMC tratado com LPS + ATP. A retenção na fase S pode indicar problemas na etapa de síntese do material genético ou dano no material genético o que ativa o ponto de checagem desta fase até que o DNA seja reparado.

Os nossos resultados mostraram pequenas variações na expressão de PPAR- γ , em ambas as linhagens tumorais estudadas. No entanto, nenhuma das variações observadas foram estatisticamente significativas. Em nosso modelo de estudo também não foram identificadas qualquer ligação entre a expressão de PPAR- γ e a proliferação celular. A proliferação celular se manteve estável em DU145, enquanto que nas células LNCaP foi observada uma leve diminuição da proliferação. Uma vez que não houve modulação do PPAR- γ em nosso modelo experimental a relação entre proliferação e expressão de PPAR- γ não pôde ser estabelecida. Essa modulação pode estar sendo inibida por vias de sinalização *upstream* ao PPAR- γ . Foi demonstrado que a ativação de PPAR- γ em células de câncer de próstata pelo ligante R-etodolac, uma droga anti-inflamatória, é dependente da presença de inibidores de HER2, indicando que a ativação da via de HER2 pode estar levando a degradação de PPAR- γ antes que a via possa ser ativada (HEDVAT *et al.*, 2004). Outro estudo demonstrou também, que a ativação de PPAR- γ está inibida pela presença de histonas deacetilases (HDAC) em células de câncer de próstata DU145, LNCaP e PC3 e que o tratamento com agonistas de PPAR- γ e inibidores de HDAC levam a uma diminuição da proliferação celular e também uma diminuição na invasibilidade com aumento da expressão de E-caderina na linhagem celular PC3 (ANNICOTTE *et al.*, 2006). Em associação, estudos realizados com as linhagens de câncer de próstata DU145, PC-3 e LNCaP e de câncer de bexiga TSU-Pr1, TSU-Pr1-B1, TSU-Pr1-B2, indicam que a diminuição da proliferação após ativação de PPAR- γ por agonistas como glitazonas, ocorre de forma independentemente de PPAR- γ (CHAFFER *et al.*, 2006). Estudos adicionais com este modelo deverão ser executados para se obter uma conclusão acerca desta relação.

Mediante estímulo pró-inflamatório, foi observado também um aumento da fragmentação do material genético nas linhagens DU145 e LNCaP, especialmente nos pontos estimulados com os sobrenadantes de PBMC tratados com LPS ou LPS + ATP. O fenômeno de condensação da cromatina e fragmentação nuclear ocorre durante os processos de morte celular por apoptose ou piroptose (STRASSER, O'CONNOR e DIXIT, 2000; FINK e COOKSON, 2006). Sendo assim, foram analisadas algumas características que pudessem elucidar o processo pelo qual a fragmentação nuclear estava ocorrendo. Uma vez que observamos a secreção da citocina IL-1 β nas linhagens de câncer de próstata, foi avaliada a expressão do complexo proteico responsável pela maturação e secreção dessa citocina, o inflamassoma (MARTINON, BURNS e TSCHOPP, 2002). Para isso, foi avaliada a expressão do receptor NLRP3 um dos componentes dos inflamassoma NLRP3, que é o mais discutido na literatura científica e que pode ser ativado pelo conjunto de sinais LPS + ATP (MARIATHASAN *et al.*, 2006).

Nas células DU145 após o estímulo com os sobrenadantes de PBMC tratados ou não, foi observado um aumento na expressão de NLRP3, indicando que esse inflamassoma pode ser o responsável pela maturação e secreção da citocina IL-1 β nesta linhagem. A expressão de componentes do inflamassoma NLRP3 em câncer de fígado foi investigada e demonstrou uma correlação entre a progressão tumoral e a diminuição da expressão dos componentes do inflamassoma, indicando um papel protetor nesse modelo (WEI *et al.*, 2014). No entanto, pouco se sabe sobre a expressão e ativação do inflamassoma em células cancerígenas. Não se pode determinar exatamente quais as moléculas presentes no sobrenadante inflamatório que podem estar levando à ativação do inflamassoma NLRP3, mas pode-se avaliar como essa ativação pode ocorrer. Por isso, a liberação de espécies reativas de oxigênio em ambas as linhagens foi avaliada. Observou-se então, que na linhagem DU145 ocorreu um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio após os estímulos inflamatórios, o que indica que a ativação de NLRP3 nessa linhagem pode estar ocorrendo devido à liberação de ROS, mediante aumento da expressão do receptor NLRP3 e consequente secreção de IL-1 β . Foi demonstrado que na ativação de NLRP3 mediada por ROS, a mitocôndria é a principal fonte de produção de ROS (NAKAHIRA *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2011). Nesse contexto, já foi evidenciado também que inibidores de

produção de ROS via mitocôndria (NAKAHIRA *et al.*, 2011) e o bloqueio da respiração celular levam a uma diminuição na ativação de NLRP3.

O mesmo parece estar ocorrendo com linhagem LNCaP, uma vez que detectamos aumento da expressão de NLRP3 e ROS, após estímulo inflamatório. Agonistas de NLRP3 levam à liberação de espécies reativas de oxigênio promovendo a ativação do inflamassoma (CRUZ *et al.*, 2007; CASSEL *et al.*, 2008; DOSTERT *et al.*, 2008).

Um dos eventos ligados aos processos de morte celular por apoptose ou piroptose, é a clivagem da proteína PARP1 em um fragmento de 89kDa (STRASSER, O'CONNOR e DIXIT, 2000; MALIREDDI *et al.*, 2010). A presença da proteína PARP1 clivada foi analisada para as linhagens estudadas. Nas células DU145 foi observado um aumento de PARP1 clivada após o estímulo de PBMC tratados com LPS e LPS + ATP. Em conjunto com o aumento da expressão de NLRP3 após os mesmo estímulos, estes dados sugerem que a fragmentação do material genético observada nestas amostras pode estar ocorrendo via piroptose. A morte celular por piroptose já foi relacionada à infecção por HIV (DOITSH *et al.*, 2014), inalação de partículas de carbono (REISETTER *et al.*, 2011) e também a casos de imunossupressão após tratamentos quimioterápicos e infecções virais (MASTERS *et al.*, 2012). No entanto, não existem registros da ligação direta entre o câncer e a piroptose.

As células da linhagem LNCaP apresentaram uma variação na presença de PARP1 clivada em relação a expressão de NLRP3. Alguns estudos demonstraram que nem sempre a clivagem de PARP1 é necessária durante a piroptose (CHEN *et al.*, 1996; FINK e COOKSON, 2006). Embora, a clivagem de PARP1 também ocorra durante a apoptose, esse tipo de morte celular não é inflamatória e não está relacionada com a produção e secreção de IL-1 β uma vez que não há envolvimento da ativação do sistema imune e de caspase1 (MIAO, RAJAN e ADEREM, 2011), diferente do que foi observado em nossos ensaios.

Leucócitos presentes no microambiente inflamatório de câncer de próstata apresentam uma maior expressão de caspase1 (KHAMIS *et al.*, 2010), o que indica uma pré-disposição do microambiente inflamatório tumoral à ativação do inflamassoma levando à secreção de mediadores inflamatórios. Após a formação do inflamassoma ocorre a ativação da caspase1 que leva a maturação das citocinas IL-1 β e IL-18. As citocinas maturadas, assim como a caspase 1, são secretadas. Embora tenha sido demonstrada uma

diminuição na expressão de caspase1 e 3 nas células de câncer de próstata DU145, LNCaP e PC3 (WINTER *et al.*, 2001), observou-se a secreção de IL-1 β nas linhagens DU145 e LNCaP, indicando a presença e ativação de caspase1 (MIAO, RAJAN e ADEREM, 2011). Foi demonstrado também que as linhagens de câncer de próstata DU145, LNCaP e PC3 produzem a citocina IL-18, o que reforça que tais células podem ativar caspase1, e que seu receptor IL-18R é expresso nas células andrógeno independentes DU145, mas está ausente nas células andrógeno sensíveis LNCaP (LEBEL-BINAY *et al.*, 2003).

A proteína NLRP3 em sua forma ativada requer a presença da proteína adaptadora ASC para a formação do inflamassoma a ativação de caspase1. Sabe-se que a proteína ASC é normalmente expressa na linhagem DU145 e metilada na linhagem LNCaP (DAS *et al.*, 2006). No entanto, a superexpressão de ASC já foi relacionado a um aumento na fragmentação nuclear e diminuição na proliferação da linhagem de células cancerígenas embrionárias do rim (293) (MCCONNELL e VERTINO, 2000).

No entanto, não fica claro o papel da inflamação sobre a manutenção do estado tumoral e seus agravos como o estabelecimento de metástases. Sendo assim, avaliamos o perfil de células tronco tumorais das linhagens de câncer de próstata DU145 e LNCaP em busca de uma relação entre o estímulo inflamatório e esta importante propriedade fenotípica do câncer. As células tronco tumorais da próstata vem sendo caracterizada com uma pequena sub-população com capacidade de autorenovação e diferenciação, por isso possuem papel definidor na recorrência do câncer de próstata após tratamento (JORDAN, GUZMAN e NOBLE, 2006; POLYAK e HAHN, 2006; AL-HAJJ, 2007). O fenótipo CD44⁺/CD24⁻ vem sendo utilizado como uma das características da população de células tronco tumorais da próstata (HURT *et al.*, 2008; SEILER *et al.*, 2013). Células de câncer de próstata CD44⁺ já haviam sido identificadas com as mesmas propriedades das células tronco normais para a diferenciação, o implica elevado potencial metastático (PATRAWALA *et al.*, 2006). Posteriormente, Hurt et al (2008) identificou em células LNCaP e DU145, a população de células tronco tumorais CD44⁺/CD24⁻ como sendo uma população ainda mais desdiferenciada e contendo as mesmas características de células tronco tumorais.

A porcentagem de células tronco tumorais CD44⁺/CD24⁻ encontradas nas linhagens DU145 e LNCaP não estimuladas, são similares aos já encontrados previamente. (HURT *et*

al., 2008). Após estímulo inflamatório com os sobrenadantes de PBMC tratados com LPS e LPS + ATP, a linhagem andrógeno independente DU145, apresentou um aumento significativo na população de células tronco tumorais, indicando que a inflamação pode influenciar na dinâmica dessa sub-população. Células CD44⁺ apresentam um maior potencial de invasibilidade (KLARMANN *et al.*, 2009) e a sub-população CD44⁺/CD24⁻ tem a capacidade de iniciar novos tumores, já que cerca de 1.000 células CD44⁺/CD24⁻ foram capazes de gerar novos tumores em camundongos enquanto as células sem essa sub-população não exibiram potencial tumorigênico (HURT *et al.*, 2008).

O aumento da população de células tronco tumorais da linhagem DU145 após o estímulo inflamatório sugerem que a inflamação, por mecanismos ainda desconhecidos, induz a desdiferenciação de células tumorais normais. A morte celular por piroptose pode levar à um aumento na inflamação local levando a essa resposta fenotípica. Uma das terapias mais convencionais para o tratamento do câncer de próstata se faz por meio da privação de andrógenos. Esse tratamento promove a regressão tumoral, porém, em alguns casos, se observa o crescimento tumoral independente de andrógeno (AMMIRANTE *et al.*, 2010). Nossos dados sugerem que este fenômeno pode estar relacionado com a concomitância entre o tratamento do câncer e um processo inflamatório em progressão ocorrendo na região do tumor ou em tecidos adjacentes. Esta inflamação estaria contribuindo com os mediadores que promoveriam a mudança de perfil nas populações de células tronco tumorais, o que levaria à resistência do tumor ao tratamento.

As células LNCaP, no entanto, apresentaram um aumento na população de células CD44⁺/CD24⁺ quando estimuladas diretamente com LPS + ATP. Embora o fenótipo CD44⁺/CD24⁻ seja mais caracterizado, sabe-se que as células CD44⁺ apenas, são extremamente tumorigênicas e possuem capacidade de diferenciação, levando à formação de tumores em modelos de camundongos (PATRAWALA *et al.*, 2006). Da mesma forma, a alta expressão de CD24 ou marcação positiva para essa proteína, já foi relacionada a um maior potencial tumorigênico e a um mau prognóstico em diversos cânceres (KRISTIANSEN, SAMMAR e ALTEVOGT, 2004). Sendo assim, a partir dos resultados observados, pode-se sugerir que o perfil inflamatório modula o potencial metastático das células de câncer de próstata o que contribuiria para um mau prognóstico para portadores

deste tipo de câncer. Estudos adicionais acerca destes fenótipos estão em andamento em nosso laboratório de forma a esclarecer estes pontos.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com os resultados obtidos neste trabalho, concluímos que:

1) O microambiente inflamatório e os mediadores inflamatórios secretados pelo infiltrado imune exercem um papel significativo na manutenção do estado tumoral da próstata podendo ainda estar relacionado com o agravamento desta doença.

2) A ativação do inflamassoma NLRP3 e a secreção da citocina IL-1 β em células de câncer de próstata parecem estar relacionadas ao aumento de espécies reativas de oxigênio no meio intracelular após a indução inflamatória.

3) A identificação de características como fragmentação nuclear, clivagem de PARP1, formação do inflamassoma e ativação de caspase1, sugerem que o processo de morte observado nas condições de nossos ensaios foi piroptose.

4) O aumento da população de células tronco tumorais após estímulo inflamatório sugere que a inflamação no câncer de próstata pode levar a um pior prognóstico para o portador da doença, uma vez que aumenta o seu potencial metastático podendo inclusive estar envolvida no processo de recidiva após tratamento com privação de andrógenos.

5) A proteína PPAR- γ , que também possui papel no metabolismo lipídico, parece não participar de nenhum dos fenômenos celulares observados nas condições experimentais aplicadas às linhagens estudadas.

A partir de nossos resultados, formulamos diversas outras questões que ainda devem ser estudadas. Serão necessários, por exemplo, experimentos adicionais que demonstrem diretamente a ativação de caspase1 e que comprovem a formação dos poros na membrana das células, para a caracterização do processo de morte celular como piroptose. Da mesma forma, será necessário verificar se o processo de morte celular ocorre de forma dependente da clivagem de PARP1, já que em alguns pontos onde houve fragmentação do material genético, observamos uma diminuição em PARP1 clivada. A questão mais importante que ainda precisa ser compreendida é como a inflamação regula as células tronco tumorais, já que a morte celular por piroptose pode estar participando dessa regulação. Além disso, é preciso identificar quais os aspectos metastáticos são influenciados por esse aumento na população de células tronco.

6. REFERÊNCIAS

- ABDUL, M.; HOOSEIN, N. Differences in the expression and effects of interleukin-1 and -2 on androgen-sensitive and -insensitive human prostate cancer cell lines. **Cancer Lett**, v. 149, n. 1-2, p. 37-42, 2000.
- ABRAHAM, B. K. *et al.* . Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 3, p. 1154-9, 2005.
- AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R. V.; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 2, p. 425-30, 2009.
- AL-HAJJ, M. Cancer stem cells and oncology therapeutics. **Curr Opin Oncol**, v. 19, n. 1, p. 61-4, 2007.
- AL-HAJJ, M. *et al.* . Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 7, p. 3983-8, 2003.
- AMES, B. N.; GOLD, L. S.; WILLETT, W. C. The causes and prevention of cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 12, p. 5258-65, 1995.
- AMMIRANTE, M. *et al.* . B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. **Nature**, v. 464, n. 7286, p. 302-5, 2010.
- ANNICOTTE, J. S. *et al.* . Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates E-cadherin expression and inhibits growth and invasion of prostate cancer. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 20, p. 7561-74, 2006.
- ANTONELLI, A. *et al.* . New targeted therapies for anaplastic thyroid cancer. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 12, n. 1, p. 87-93, 2012.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-45, 2001.
- BERDASCO, M.; ESTELLER, M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. **Dev Cell**, v. 19, n. 5, p. 698-711, 2010.
- BOURAOUI, Y. *et al.* . Pro-inflammatory cytokines and prostate-specific antigen in hyperplasia and human prostate cancer. **Cancer Detect Prev**, v. 32, n. 1, p. 23-32, 2008.
- CASSEL, S. L. *et al.* . The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 26, p. 9035-40, 2008.
- CATALANO, S. *et al.* . In vivo and in vitro evidence that PPARgamma ligands are antagonists of leptin signaling in breast cancer. **Am J Pathol**, v. 179, n. 2, p. 1030-40, 2011.
- CHAFFER, C. L. *et al.* . PPARgamma-independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma. **BMC Cancer**, v. 6, p. 53, 2006.
- CHAN, J. M. *et al.* . The epidemiology of prostate cancer--with a focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 20, n. 4, p. 797-809, 2006.
- CHEN, Y. *et al.* . A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. **EMBO J**, v. 15, n. 15, p. 3853-60, 1996.
- CHUNG, T. D. *et al.* . Characterization of the role of IL-6 in the progression of prostate cancer. **Prostate**, v. 38, n. 3, p. 199-207, 1999.
- COLLINS, A. T. *et al.* . Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. **Cancer Res**, v. 65, n. 23, p. 10946-51, 2005.

CRUZ, C. M. *et al.* . ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. **J Biol Chem**, v. 282, n. 5, p. 2871-9, 2007.

CULIG, Z. *et al.* . Interleukin 1beta mediates the modulatory effects of monocytes on LNCaP human prostate cancer cells. **Br J Cancer**, v. 78, n. 8, p. 1004-11, 1998.

DAS, P. M. *et al.* . Methylation mediated silencing of TMS1/ASC gene in prostate cancer. **Mol Cancer**, v. 5, p. 28, 2006.

DAVIS, B. K.; WEN, H.; TING, J. P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 707-35, 2011.

DAWSON, M. A.; KOUZARIDES, T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 12-27, 2012.

DE MARZO, A. M. *et al.* . Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. **Am J Pathol**, v. 155, n. 6, p. 1985-92, 1999.

DE MARZO, A. M. *et al.* . Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256-69, 2007.

DOITSH, G. *et al.* . Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 509-14, 2014.

DOSTERT, C. *et al.* . Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 674-7, 2008.

DU, L. *et al.* . CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 21, p. 6751-60, 2008.

DUTT, S. S.; GAO, A. C. Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression. **Future Oncol**, v. 5, n. 9, p. 1403-13, 2009.

ERSHLER, W. B.; KELLER, E. T. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. **Annu Rev Med**, v. 51, p. 245-70, 2000.

ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 4, p. 286-98, 2007.

FAJAS, L. *et al.* . The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. **J Biol Chem**, v. 272, n. 30, p. 18779-89, 1997.

FAJAS, L.; DEBRIL, M. B.; AUWERX, J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: from adipogenesis to carcinogenesis. **J Mol Endocrinol**, v. 27, n. 1, p. 1-9, 2001.

FEINBERG, A. P.; VOGELSTEIN, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature**, v. 301, n. 5895, p. 89-92, 1983.

FENG, C. *et al.* . Regulatory factor X1 is a new tumor suppressive transcription factor that acts via direct downregulation of CD44 in glioblastoma. **Neuro Oncol**, 2014.

FERLAY, J. *et al.* . Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893-917, 2010.

FERRARI, D. *et al.* . Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. **J Immunol**, v. 159, n. 3, p. 1451-8, 1997.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 11, p. 1812-25, 2006.

FRIEDBERG, E. C. DNA damage and repair. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 436-40, 2003.

GIERACH, G. L. *et al.* . Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer risk in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. **Breast Cancer Res**, v. 10, n. 2, p. R38, 2008.

GLOBOCAN 2012 v1.0, **Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11** [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 20/01/2014.

GOELZ, S. E. *et al.* . Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. **Science**, v. 228, n. 4696, p. 187-90, 1985.

GOMES, R. *et al.* . [Prostate cancer prevention: a review of the literature]. **Cien Saude Colet**, v. 13, n. 1, p. 235-46, 2008.

GONZALEZ-REYES, S. *et al.* . Study of TLR3, TLR4, and TLR9 in prostate carcinomas and their association with biochemical recurrence. **Cancer Immunol Immunother**, v. 60, n. 2, p. 217-26, 2011.

GOODISON, S.; URQUIDI, V.; TARIN, D. CD44 cell adhesion molecules. **Mol Pathol**, v. 52, n. 4, p. 189-96, 1999.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, 2010.

GROSS, O. *et al.* . The inflammasome: an integrated view. **Immunol Rev**, v. 243, n. 1, p. 136-51, 2011.

GUERON, G.; DE SIERVI, A.; VAZQUEZ, E. Advanced prostate cancer: reinforcing the strings between inflammation and the metastatic behavior. **Prostate Cancer Prostatic Dis**, v. 15, n. 3, p. 213-21, 2012.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

HARRIS, W. P. *et al.* . Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. **Nat Clin Pract Urol**, v. 6, n. 2, p. 76-85, 2009.

HEDVAT, M. *et al.* . Inhibition of HER-kinase activation prevents ERK-mediated degradation of PPARgamma. **Cancer Cell**, v. 5, n. 6, p. 565-74, 2004.

HOROSZEWICZ, J. S. *et al.* . LNCaP model of human prostatic carcinoma. **Cancer Res**, v. 43, n. 4, p. 1809-18, 1983.

HSING, A. W.; TSAO, L.; DEVESA, S. S. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. **Int J Cancer**, v. 85, n. 1, p. 60-7, 2000.

HUBER, M. A.; KRAUT, N.; BEUG, H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. **Curr Opin Cell Biol**, v. 17, n. 5, p. 548-58, 2005.

HUGO, H. *et al.* . Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. **J Cell Physiol**, v. 213, n. 2, p. 374-83, 2007.

HURT, E. M. *et al.* . CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. **Br J Cancer**, v. 98, n. 4, p. 756-65, 2008.

HUSSAIN, S. P.; HOFSETH, L. J.; HARRIS, C. C. Radical causes of cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 4, p. 276-85, 2003.

INCA. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2011.

INCA. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014.

IQBAL, J. *et al.* . Role of hepatitis C virus induced osteopontin in epithelial to mesenchymal transition, migration and invasion of hepatocytes. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e87464, 2014.

IYER, S. S. *et al.* . Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 48, p. 20388-93, 2009.

JAGGUPILLI, A.; ELKORD, E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 708036, 2012.

JEMAL, A. *et al.* . Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The epigenomics of cancer. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 683-92, 2007.

JORDAN, C. T.; GUZMAN, M. L.; NOBLE, M. Cancer stem cells. **N Engl J Med**, v. 355, n. 12, p. 1253-61, 2006.

KAHLENBERG, J. M. *et al.* . Potentiation of caspase-1 activation by the P2X7 receptor is dependent on TLR signals and requires NF-kappaB-driven protein synthesis. **J Immunol**, v. 175, n. 11, p. 7611-22, 2005.

KHAMIS, Z. I. *et al.* . Protein profiling of isolated leukocytes, myofibroblasts, epithelial, Basal, and endothelial cells from normal, hyperplastic, cancerous, and inflammatory human prostate tissues. **J Cancer**, v. 1, p. 70-9, 2010.

KLARMANN, G. J. *et al.* . Invasive prostate cancer cells are tumor initiating cells that have a stem cell-like genomic signature. **Clin Exp Metastasis**, v. 26, n. 5, p. 433-46, 2009.

KRISTIANSEN, G.; SAMMAR, M.; ALTEVOGT, P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. **J Mol Histol**, v. 35, n. 3, p. 255-62, 2004.

KUBOTA, T. *et al.* . Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. **Cancer Res**, v. 58, n. 15, p. 3344-52, 1998.

LAMKANFI, M. Emerging inflammasome effector mechanisms. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 3, p. 213-20, 2011.

LAMKANFI, M. *et al.* . Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 82, n. 2, p. 220-5, 2007.

LEBEL-BINAY, S. *et al.* . IL-18 is produced by prostate cancer cells and secreted in response to interferons. **Int J Cancer**, v. 106, n. 6, p. 827-35, 2003.

LEE, H. J. *et al.* . CD24, a novel cancer biomarker, predicting disease-free survival of non-small cell lung carcinomas: a retrospective study of prognostic factor analysis from the viewpoint of forthcoming (seventh) new TNM classification. **J Thorac Oncol**, v. 5, n. 5, p. 649-57, 2010.

LEMBERGER, T.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 12, p. 335-63, 1996.

LI, K. *et al.* . Role of EZH2 in the Growth of Prostate Cancer Stem Cells Isolated from LNCaP Cells. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 6, p. 11981-93, 2013.

MALIREDDI, R. K. *et al.* . Cutting edge: proteolytic inactivation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 by the Nlrp3 and Nlrc4 inflammasomes. **J Immunol**, v. 185, n. 6, p. 3127-30, 2010.

MAN, Y. G. *et al.* . Tumor-infiltrating immune cells promoting tumor invasion and metastasis: existing theories. **J Cancer**, v. 4, n. 1, p. 84-95, 2013.

MANGELSDORF, D. J.; EVANS, R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 841-50, 1995.

MANTOVANI, A. *et al.* . Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-44, 2008.

MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Curr Opin Immunol**, v. 22, n. 2, p. 231-7, 2010.

MANTOVANI, A. *et al.* . Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol**, v. 23, n. 11, p. 549-55, 2002.

MARIATHASAN, S. *et al.* . Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 228-32, 2006.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol Cell**, v. 10, n. 2, p. 417-26, 2002.

MARTINON, F. *et al.* . Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 237-41, 2006.

MASTERS, S. L. *et al.* . NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells. **Immunity**, v. 37, n. 6, p. 1009-23, 2012.

MCCONNELL, B. B.; VERTINO, P. M. Activation of a caspase-9-mediated apoptotic pathway by subcellular redistribution of the novel caspase recruitment domain protein TMS1. **Cancer Res**, v. 60, n. 22, p. 6243-7, 2000.

MENU, P.; VINCE, J. E. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly. **Clin Exp Immunol**, v. 166, n. 1, p. 1-15, 2011.

MIAO, E. A.; RAJAN, J. V.; ADEREM, A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. **Immunol Rev**, v. 243, n. 1, p. 206-14, 2011.

MONACK, D. M.; DETWEILER, C. S.; FALKOW, S. Salmonella pathogenicity island 2-dependent macrophage death is mediated in part by the host cysteine protease caspase-1. **Cell Microbiol**, v. 3, n. 12, p. 825-37, 2001.

NAKAHIRA, K. *et al.* . Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. **Nat Immunol**, v. 12, n. 3, p. 222-30, 2011.

NAOR, D. *et al.* . Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. **Semin Cancer Biol**, v. 18, n. 4, p. 260-7, 2008.

NELSON, W. G.; DE MARZO, A. M.; ISAACS, W. B. Prostate cancer. **N Engl J Med**, v. 349, n. 4, p. 366-81, 2003.

NICKEL, W.; RABOUILLE, C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 2, p. 148-55, 2009.

PAGES, F. *et al.* . Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. **Oncogene**, v. 29, n. 8, p. 1093-102, 2010.

PANG, X. *et al.* . Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation inhibits hepatocellular carcinoma cell invasion by upregulating plasminogen activator inhibitor-1. **Cancer Sci**, v. 104, n. 6, p. 672-80, 2013.

PATRAWALA, L. *et al.* . Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. **Oncogene**, v. 25, n. 12, p. 1696-708, 2006.

PIETRAS, K.; OSTMAN, A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. **Exp Cell Res**, v. 316, n. 8, p. 1324-31, 2010.

POLYAK, K.; HAHN, W. C. Roots and stems: stem cells in cancer. **Nat Med**, v. 12, n. 3, p. 296-300, 2006.

PONTA, H.; SHERMAN, L.; HERRLICH, P. A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 1, p. 33-45, 2003.

PRIBLUDA, A. *et al.* . A senescence-inflammatory switch from cancer-inhibitory to cancer-promoting mechanism. **Cancer Cell**, v. 24, n. 2, p. 242-56, 2013.

RANGASWAMI, H.; BULBULE, A.; KUNDU, G. C. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. **Trends Cell Biol**, v. 16, n. 2, p. 79-87, 2006.

RASSOULI, F. B. *et al.* . Evaluating stem and cancerous biomarkers in CD15+CD44+ KYSE30 cells. **Tumour Biol**, v. 34, n. 5, p. 2909-20, 2013.

REISETTER, A. C. *et al.* . Induction of inflammasome-dependent pyroptosis by carbon black nanoparticles. **J Biol Chem**, v. 286, n. 24, p. 21844-52, 2011.

RICKE, E. A. *et al.* . Androgen hormone action in prostatic carcinogenesis: stromal androgen receptors mediate prostate cancer progression, malignant transformation and metastasis. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 7, p. 1391-8, 2012.

ROUDI, R. *et al.* . CD44 and CD24 cannot act as cancer stem cell markers in human lung adenocarcinoma cell line A549. **Cell Mol Biol Lett**, 2013.

RUSSELL, P. J.; KINGSLEY, E. A. Human prostate cancer cell lines. **Methods Mol Med**, v. 81, p. 21-39, 2003.

RYBAK, A. P.; INGRAM, A. J.; TANG, D. Propagation of human prostate cancer stem-like cells occurs through EGFR-mediated ERK activation. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61716, 2013.

SALMAN, H. *et al.* . Human prostate cancer cells induce inflammatory cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells. **Biomed Pharmacother**, v. 66, n. 5, p. 330-3, 2012.

SANAAT, Z. *et al.* . Immunohistochemical Analysis of p53, Ki-67, CD44, HER-2/neu Expression Patterns in Gastric Cancer, and Their Association with One Year Survival in North-West of Iran. **Int J Hematol Oncol Stem Cell Res**, v. 7, n. 3, p. 15-20, 2013.

SANZ, J. M.; DI VIRGILIO, F. Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. **J Immunol**, v. 164, n. 9, p. 4893-8, 2000.

SCHIAVONI, G.; GABRIELE, L.; MATTEI, F. The tumor microenvironment: a pitch for multiple players. **Front Oncol**, v. 3, p. 90, 2013.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821-32, 2010.

SEILER, D. *et al.* . Enrichment of putative prostate cancer stem cells after androgen deprivation: upregulation of pluripotency transactivators concurs with resistance to androgen deprivation in LNCaP cell lines. **Prostate**, v. 73, n. 13, p. 1378-90, 2013.

SEWALT, R. G. *et al.* . Characterization of interactions between the mammalian polycomb-group proteins Enx1/EZH2 and EED suggests the existence of different mammalian polycomb-group protein complexes. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 6, p. 3586-95, 1998.

SFANOS, K. S.; DE MARZO, A. M. Prostate cancer and inflammation: the evidence. **Histopathology**, v. 60, n. 1, p. 199-215, 2012.

SHAPPELL, S. B. *et al.* . 15S-Hydroxyeicosatetraenoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma and inhibits proliferation in PC3 prostate carcinoma cells. **Cancer Res**, v. 61, n. 2, p. 497-503, 2001.

SHEBL, F. M. *et al.* . Aspirin but not ibuprofen use is associated with reduced risk of prostate cancer: a PLCO study. **Br J Cancer**, v. 107, n. 1, p. 207-14, 2012.

SHIMAMURA, M. *et al.* . Analysis of multiple markers for cancer stem-like cells in human thyroid carcinoma cell lines. **Endocr J**, 2014.

SIKKA, S. *et al.* . Targeting PPARgamma Signaling Cascade for the Prevention and Treatment of Prostate Cancer. **PPAR Res**, v. 2012, p. 968040, 2012.

SIMIANTONAKI, N. *et al.* . Reduced expression of TLR4 is associated with the metastatic status of human colorectal cancer. **Int J Mol Med**, v. 20, n. 1, p. 21-9, 2007.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 2, p. 89-102, 2010.

SLOMIANY, M. G. *et al.* . Inhibition of Functional Hyaluronan-CD44 Interactions in CD133-positive Primary Human Ovarian Carcinoma Cells by Small Hyaluronan Oligosaccharides. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 24, p. 7593-7601, 2009.

SMALLRIDGE, R. C. *et al.* . Efatutazone, an oral PPAR-gamma agonist, in combination with paclitaxel in anaplastic thyroid cancer: results of a multicenter phase 1 trial. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 6, p. 2392-400, 2013.

STONE, K. R. *et al.* . Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). **Int J Cancer**, v. 21, n. 3, p. 274-81, 1978.

STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annu Rev Biochem**, v. 69, p. 217-45, 2000.

SUBURU, J.; CHEN, Y. Q. Lipids and prostate cancer. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 98, n. 1-2, p. 1-10, 2012.

SY, M. S.; GUO, Y. J.; STAMENKOVIC, I. Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo. **J Exp Med**, v. 174, n. 4, p. 859-66, 1991.

SZAJNIK, M. *et al.* . TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer. **Oncogene**, v. 28, n. 49, p. 4353-63, 2009.

TANIUCHI, K.; NISHIMORI, I.; HOLLINGSWORTH, M. A. Intracellular CD24 inhibits cell invasion by posttranscriptional regulation of BART through interaction with G3BP. **Cancer Res**, v. 71, n. 3, p. 895-905, 2011.

THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 6, p. 442-54, 2002.

TINDALL, E. A. *et al.* . Interleukin-6 promoter variants, prostate cancer risk, and survival. **Prostate**, v. 72, n. 16, p. 1701-7, 2012.

VERHEUL, H. M.; VOEST, E. E.; SCHLINGEMANN, R. O. Are tumours angiogenesis-dependent? **J Pathol**, v. 202, n. 1, p. 5-13, 2004.

VIOLA, A. *et al.* . The pros and cons of chemokines in tumor immunology. **Trends Immunol**, v. 33, n. 10, p. 496-504, 2012.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nat Med**, v. 10, n. 8, p. 789-99, 2004.

WANG, R. *et al.* . Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. **Nature**, v. 468, n. 7325, p. 829-33, 2010.

WEI, Q. *et al.* . Deregulation of the NLRP3 inflammasome in hepatic parenchymal cells during liver cancer progression. **Lab Invest**, v. 94, n. 1, p. 52-62, 2014.

WILT, T. J.; AHMED, H. U. Prostate cancer screening and the management of clinically localized disease. **BMJ**, v. 346, p. f325, 2013.

WILT, T. J.; THOMPSON, I. M. Clinically localised prostate cancer. **BMJ**, v. 333, n. 7578, p. 1102-6, 2006.

WINTER, R. N. *et al.* . Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. **Cancer Res**, v. 61, n. 3, p. 1227-32, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Global Burden of Disease: 2004 Update**. Geneva: World Health Organization; 2008.

YOU, J. S.; JONES, P. A. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? **Cancer Cell**, v. 22, n. 1, p. 9-20, 2012.

ZHOU, R. *et al.* . A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, v. 469, n. 7329, p. 221-5, 2011.

7. APÊNDICES

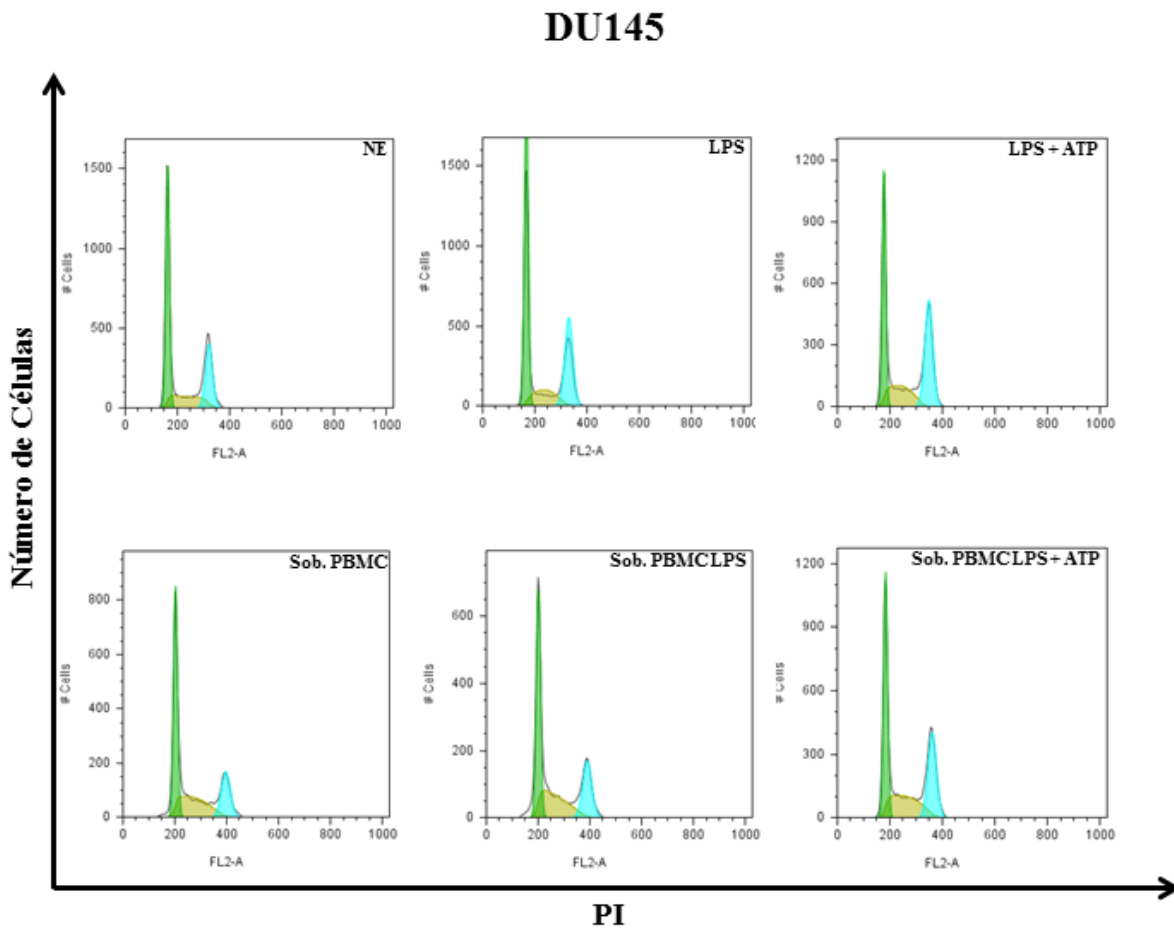
APÊNDICE A - **Resumo dos resultados com as células DU145.** Tabela com o resumo dos resultados obtidos com as células da linhagem DU145, identificando os pontos em que foram observadas as mudanças significativas para cada experimento realizado. O símbolo + identifica os pontos em que foram observados aumentos dos parâmetros e o símbolo – onde foram observadas diminuições.

DU145	LPS	L+A	Sob. PBMC	Sob. PBMC LPS	Sob. PBMC L+ A
IL-1β				+	+
IL-6				+	
TNF-α					
Ciclo Celular					
Fragmentação de DNA		+	+	+	+
Proliferação					
PPAR-γ					
NLRP3	-	-	+	+	+
PARP1 clivada				+	+
ROS		+		+	+
CD44+/CD24-				+	+

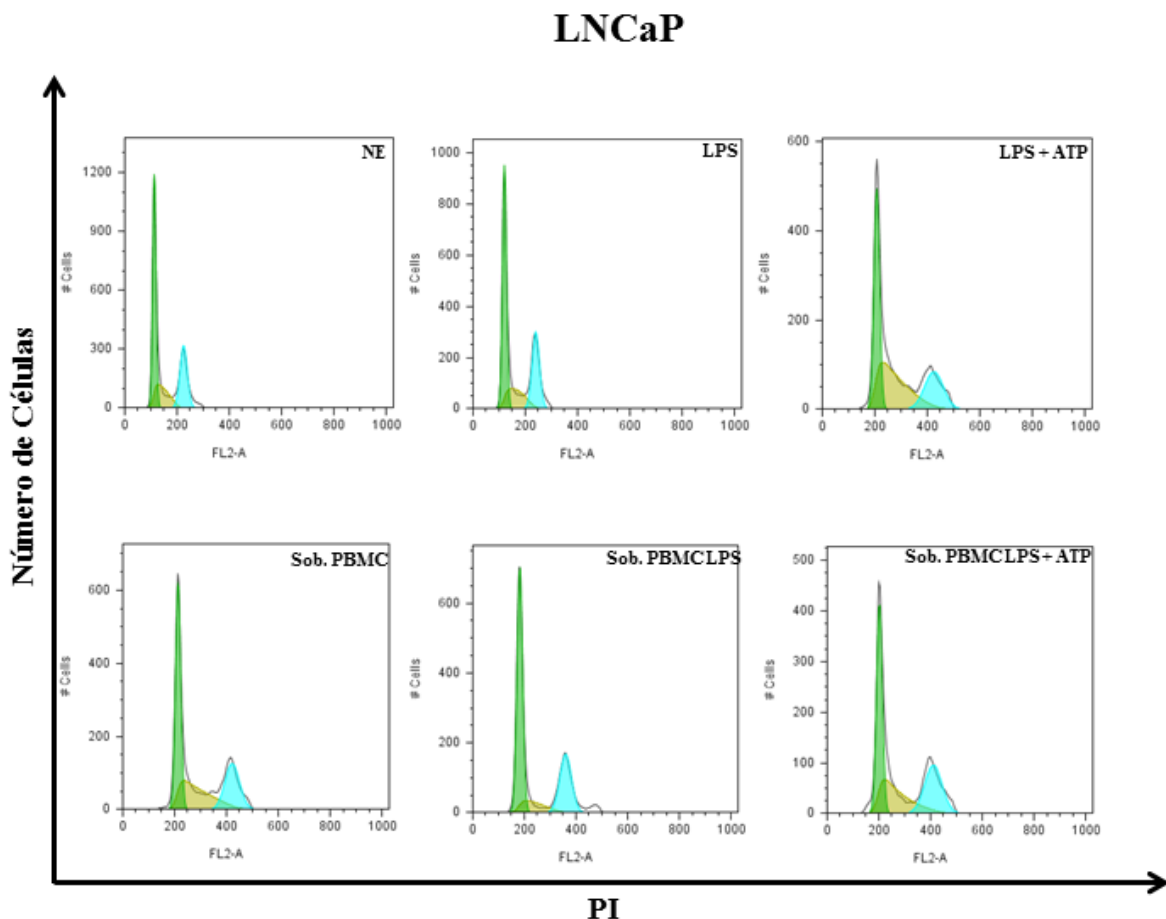
APÊNDICE B - **Resumo dos resultados com as células LNCaP.** Tabela com o resumo dos resultados obtidos com as células da linhagem LNCaP, identificando os pontos em que foram observadas as mudanças significativas para cada experimento realizado. O símbolo + identifica os pontos em que foram observados aumentos dos parâmetros e o símbolo – onde foram observadas diminuições.

LNCaP	LPS	L+A	Sob. PBMC	Sob. PBMC LPS	Sob. PBMC L+ A
IL-1β				+	
IL-6					
TNF-α					
Ciclo Celular					
Fragmentação de DNA		+	+	+	+
Proliferação	-	-	-	-	-
PPAR-γ					
NLRP3	+	+		+	+
PARP1 clivada	-	+	-	+	-
ROS	+		+	+	+
CD44+/CD24-					

APÊNDICE C - Alteração no ciclo celular das células tumorais de próstata DU145 após estímulo pró-inflamatório. As células da linhagem de câncer de próstata DU145, 24h após serem estimuladas ou não estimuladas, foram avaliadas por marcação com PI em citometria de fluxo quanto à porcentagem de células nas fases do ciclo celular visualizadas no gráfico como G0/G1 em verde, S em amarelo e G2 em azul. Os estímulos utilizados foram: LPS (1µg/ml, *overnight*); LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h); Sobrenadante de PBMC; Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) e Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h). As análises foram realizadas na plataforma de ciclo celular do programa FlowJo. Gráficos representativos de três experimentos independentes em monoplicata.

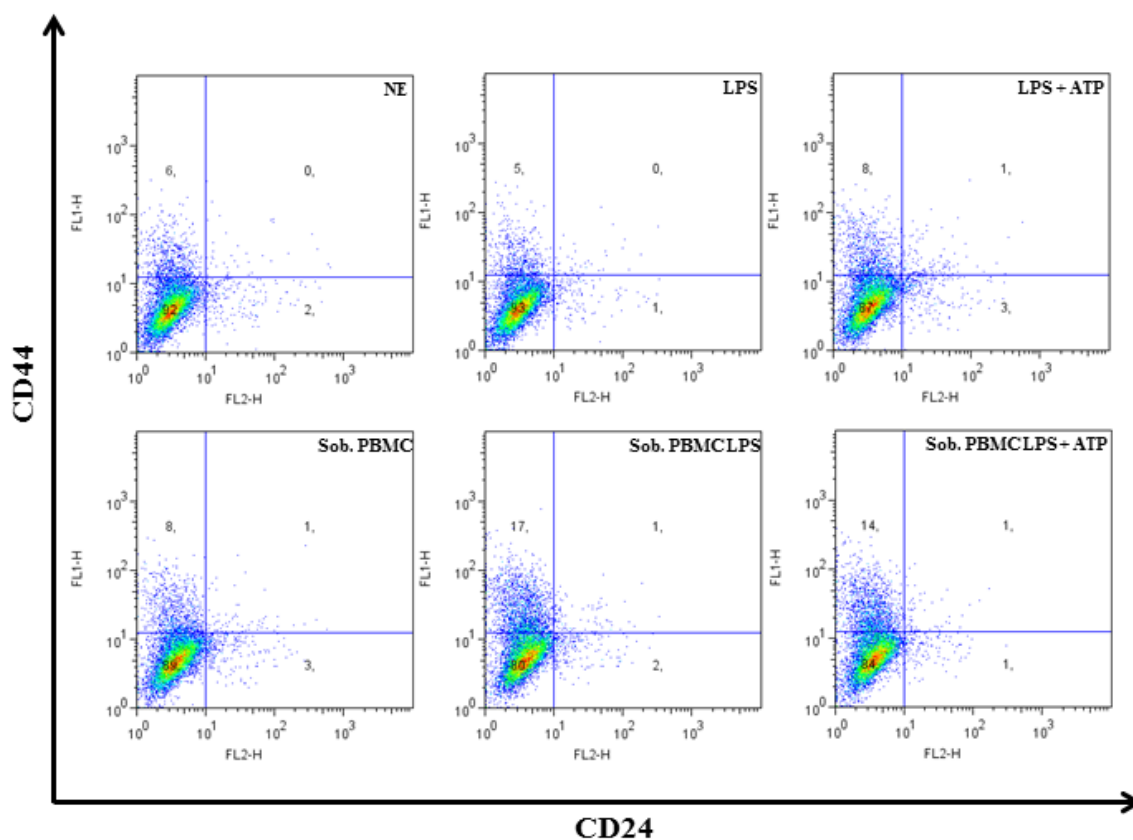


APÊNDICE D - Alteração no ciclo celular das células tumorais de próstata LNCaP após estímulo pró-inflamatório. As células da linhagem de câncer de próstata LNCaP, 24h após serem estimuladas ou não estimuladas, foram avaliadas por marcação com PI em citometria de fluxo quanto à porcentagem de células nas fases do ciclo celular visualizadas no gráfico como G0/G1 em verde, S em amarelo e G2 em azul. Os estímulos utilizados foram: LPS (1µg/ml, *overnight*); LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h); Sobrenadante de PBMC; Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) e Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h). As análises foram realizadas na plataforma de ciclo celular do programa FlowJo. Gráficos representativos de três experimentos independentes em monoplicata.

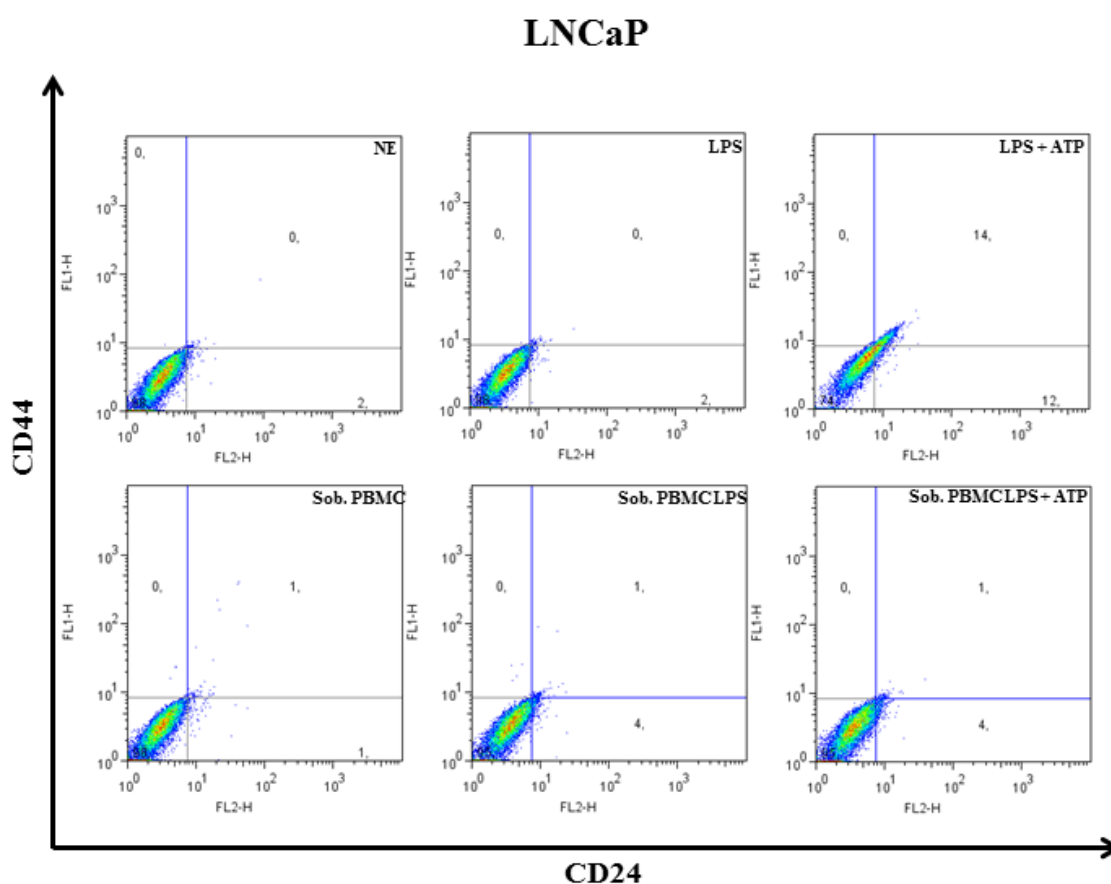


APÊNDICE F - **Mudanças no fenótipo CD44/CD24 das células DU145 após estímulo inflamatório.** Células DU145 não estimuladas (NE) e estimuladas com LPS (1µg/ml, *overnight*); LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h); Sobrenadante de PBMC; Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) e Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h), foram analisadas por citometria de fluxo para avaliar os fenótipos CD44/CD24. Valores referentes a três experimentos independentes em monoplicata. Controles de isotipos foram utilizados como duplos negativos para a definição dos quadrantes.

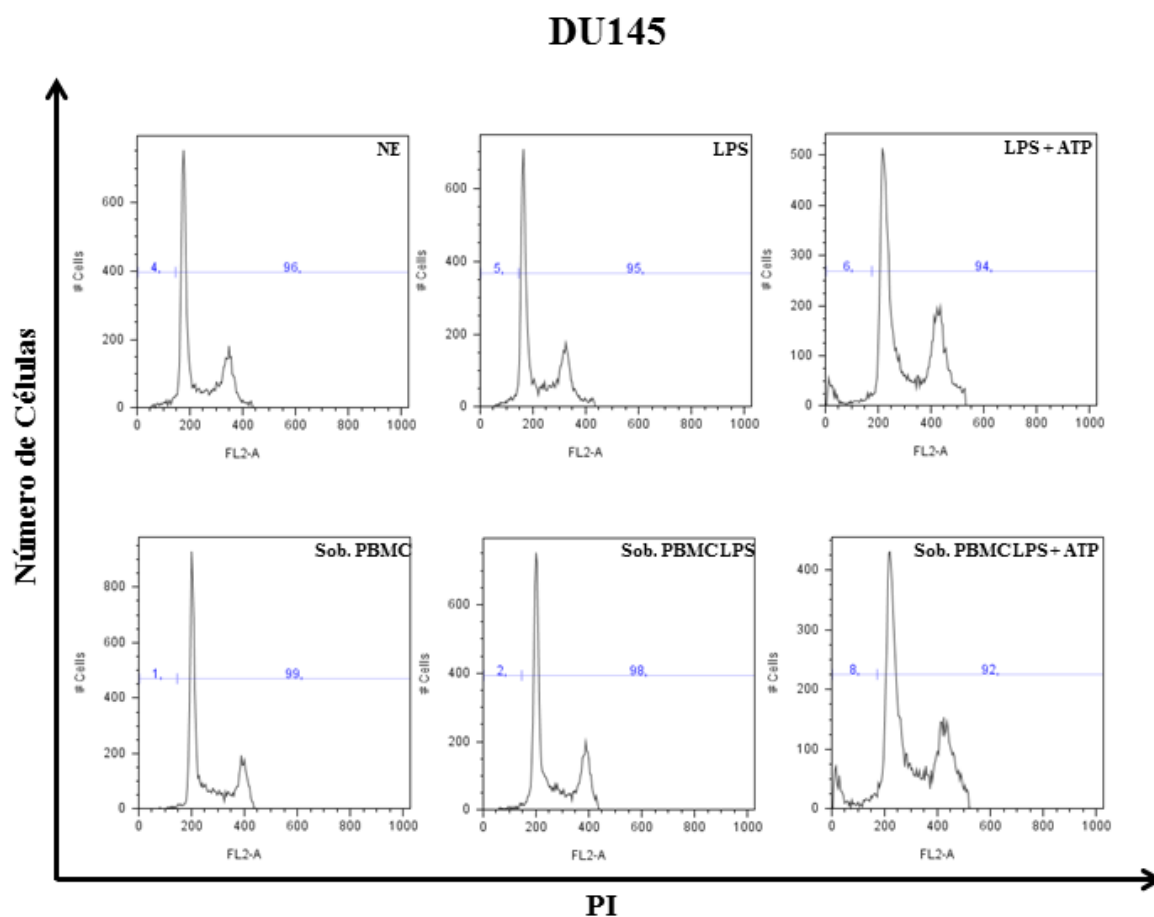
DU145



APÊNDICE G - Mudanças no fenótipo CD44/CD24 das células LNCaP após estímulo inflamatório. Células LNCaP não estimuladas (NE) e estimuladas com LPS (1µg/ml, *overnight*); LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h); Sobrenadante de PBMC; Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) e Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h), foram analisadas por citometria de fluxo para avaliar os fenótipos CD44/CD24. Valores referentes a três experimentos independentes em monoplicata. Controles de isotipos foram utilizados como duplos negativos para a definição dos quadrantes.



APÊNDICE H - **Estímulos pró-inflamatórios levam à fragmentação nuclear das células de câncer de próstata DU145** . Avaliação da fragmentação nuclear por marcação com PI em citometria de fluxo, nas células DU145 não estimuladas (NE) ou após os estímulo pró-inflamatórios LPS (1µg/ml, *overnight*); LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h); Sobrenadante de PBMC; Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) e Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h). As análises foram realizadas 24h após estímulo. Gráfico referente a três experimentos independentes em monoplicata. Os valores de Sub-G1 estão a esquerda, referentes ao pico de menor intensidade.



APÊNDICE I - Estímulos pró-inflamatórios levam à fragmentação nuclear das células de câncer de próstata LNCaP . Avaliação da fragmentação nuclear por marcação com PI em citometria de fluxo, nas células LNCaP não estimuladas (NE) ou após os estímulo pró-inflamatórios LPS (1µg/ml, *overnight*); LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h); Sobrenadante de PBMC; Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) e Sobrenadante de PBMC estimulado com LPS (1µg/ml, *overnight*) + ATP (5mM, 1h). As análises foram realizadas 24h após estímulo. Gráfico referente a três experimentos independentes em monoplicata. Os valores de Sub-G1 estão a esquerda, referentes ao pico de menor intensidade.

