Camila Belfort Piantino

**Estabelecimento de linhagens tumorais para estudos
in vitro e *in vivo* de carcinoma urotelial da bexiga e
adenocarcinoma de próstata**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Urologia
Orientadora: Dra. Kátia Ramos Moreira Leite

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Piantino, Camila Belfort

Estabelecimento de linhagens tumorais para estudos *in vitro* e *in vivo* de carcinoma urotelial da bexiga e adenocarcinoma de próstata / Camila Belfort Piantino. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Urologia.

Orientador: Kátia Ramos Moreira Leite.

Descritores: 1. Linhagem celular tumoral 2. Neoplasias da próstata 3. Neoplasias da bexiga urinária

USP/FM/SBD-253/09

Nome: PIANTINO, Camila Belfort

Título: Estabelecimento de linhagens tumorais para estudos *in vitro* e *in vivo* de carcinoma urotelial da bexiga e adenocarcinoma de próstata

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Urologia
Orientadora: Dra. Kátia Ramos Moreira Leite

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

À **Deus**, por estar sempre ao meu lado.

“Posso, tudo posso Naquele que me fortalece”

Aos meus pais, **Guido e Neide**, por abdicarem
dos seus sonhos em prol dos meus. Meus heróis!

Ao meu irmão **Danilo**, pela cumplicidade
e amizade.

Ao meu avô **Baiano**, por sua torcida
e orações.

A todas as “**flores e cravos** do meu jardim”
pela amizade e infindáveis momentos de alegria.

Ao meu namorado **Eduardo** por tudo que representa
em minha vida, por se fazer sempre presente
pelo apoio e incentivo.

Agradecimentos

À **Dra. Kátia Ramos**, pela excelente orientação e pela grande oportunidade a mim concedida de ingresso ao Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Urologia. Seu profissionalismo e postura me impulsionam. Mais do que pela oportunidade de executar este trabalho sob sua orientação, agradeço pela confiança, ensinamentos e compreensão.

Ao **Prof. Miguel Srougi**, pelo carinho e auxílio inestimável durante este percurso. De nada valeria meu esforço se não fosse seu apoio.

À **Dra. Juliana Canavez**, sem a qual este trabalho não teria sido realizado. Não encontro palavras para expressar minha eterna gratidão por sua paciência, cooperação e amizade.

À **Sabrina Reis** pela confiança em mim depositada ao me apresentar ao Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Urologia.

A todos do **LIM 55**, pelo incentivo, amizade e preciosa ajuda.

À **Dra. Marta Privato**, pela disponibilidade e valiosa contribuição a este trabalho.

À **Dra. Gilka Gattás**, por todo auxílio na execução das análises citogenéticas.

Aos membros da Banca de Qualificação: **Dr. Adriano João Nesrallah**, **Dr. Alberto Azoubel Antunes**, **Dr. Carlo Camargo Passerotti** pelos comentários e correções, os quais foram de grande valia na confecção do texto final.

A todos do grupo **Genoa Biotecnologia**.

À equipe do **Laboratório de Patologia Cirúrgica e Molecular do Hospital Sírio Libanês**, por me receberem de braços abertos, pela excelente convivência e por todo auxílio técnico.

Às secretárias da Urologia **Ionis, Elisa, Maria Aparecida e Inisabete**, pela prestatividade.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de mestrado.

À **FAPESP** pelo auxílio pesquisa 06/55151-0

Aos **pacientes** pela valiosa contribuição.

Resumo

Piantino, CB. Estabelecimento de linhagens tumorais para estudos *in vitro* e *in vivo* de carcinoma urotelial da bexiga e adenocarcinoma de próstata. 2009.109p. [Dissertação] - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Introdução: Um dos principais obstáculos para compreensão dos eventos biológicos envolvidos no câncer é a falta de modelos adequados para o estudo *in vitro* em especial em relação ao câncer de próstata (CaP) e ao câncer de bexiga (CaB). Há um número limitado de linhagens celulares de CaP e de CaB sendo a maioria proveniente de tumores invasivos e metastáticos. Sabe-se ainda, que existem diferenças étnicas entre as populações quanto ao comportamento de neoplasias. Desta forma, a pesquisa baseada em linhagens de uma população homogênea seria fonte de resultados limitados, não contemplando a diversidade que sabidamente ocorre entre os diferentes grupos. Além desse aspecto, as linhagens celulares comerciais são na sua maioria adquiridas na Coleção Americana de Culturas de Tecido (ATCC, do inglês *American Tissue Cell Culture*) que apesar de serem bem padronizadas, requerem processos de importação com aumento do custo e demandas burocráticas que dificultam a pesquisa. Portanto, consideramos vital para a compreensão dos fenômenos relacionados à carcinogênese, assim como estudos de resistência a drogas, quimioprevenção e novas estratégias terapêuticas, o desenvolvimento de linhagens tumorais derivadas de tumores primários que acometem a nossa população, peculiarmente miscigenada. No presente trabalho, fragmentos de carcinoma urotelial da bexiga e de adenocarcinoma da próstata foram obtidos durante cirurgia para remoção de tumores primários de pacientes tratados e acompanhados na Divisão de Urologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e no Hospital Sírio Libanês. As linhagens estabelecidas a partir destes fragmentos foram caracterizadas através da análise da cinética de

crescimento, análises imunocitoquímicas e anormalidades cromossômicas incluindo cariótipo e hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Além disso, as linhagens obtidas foram submetidas a estudos de quimiossensibilidade com o uso dos compostos curcumin e Prima-1. Avaliamos ainda, a tumorigenicidade de nossas linhagens em camundongos atímicos. Os resultados deste trabalho demonstram o desenvolvimento de três linhagens de CaB e três linhagens de CaP sendo as mesmas não tumorigênicas em camundongos atímicos. Além disso, demonstramos que o curcumin na concentração de 50 μ M induziu morte celular em todas as linhagens estudadas, sendo seu efeito mais evidente nas linhagens de CaP. Por fim, Prima-1 reduziu a viabilidade celular independente do status de *p53* nas linhagens de CaB.

Descritores: 1.Linhagem celular tumoral 2.Neoplasias da próstata 3.Neoplasias da bexiga urinária.

Summary

Piantino, CB. Establishment of tumor cell lines from prostate adenocarcinoma and bladder urothelial carcinoma, for *in vitro* and *in vivo* studies. 2009. 109p. [Dissertation] - College of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, 2009.

Introduction: One of the main obstacles for understanding biological events involved in cancer is the lack of appropriated models for *in vitro* studies especially for prostate cancer (PC) and bladder cancer (BC). There are a limited number of PC and BC cell lines being the majority originated from metastatic and invasive tumors. Also it is well known that there are ethnic differences between populations concerning the behavior of tumors. In such a way, the research based on cell lines derived from a homogenous population should be source of limited results, not contemplating the diversity known to occur among different groups. In addition the commercial cell lines are generally acquired at American Tissue Cell Culture (ATCC) that although well-established requires importation processes with cost increase and bureaucratic demands that difficult the research. Therefore we consider vital to the comprehension of the carcinogenesis phenomena, as well as drug resistance studies, chemoprevention and new therapeutic strategies, the development of tumor lineages derived from primary tumors that assail our miscigenated population. At the present work, fragments of bladder urothelial carcinoma and prostate adenocarcinoma were obtained by surgical resection of primary tumors from patients treated and followed in the Division of Urology of the Clinical Hospital of the São Paulo University (FMUSP) and Syrian Lebanese Hospital. The cell lines established from these fragments were characterized through growth kinetic, immunocytochemistry and chromosome abnormalities including karyotyping and Fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Moreover, the cell lines were submitted to chemosensitivity studies using curcumin and Prima-1 and analyzed regarding their tumorigenicity in athymic mice. The results of this work show the development of three BC and three PC cell lines that were not

tumorigenic in athymic mice. Curcumin at 50 μ M concentration induced cell death in all studied lineages, being more effective in PC cell lines. Finally, PRIMA-1 reduced the cellular viability independent of the p53 status in BC cell lines.

Descriptors: 1.Cell line, tumor 2.Prostatic neoplasms 3.Urinary bladder neoplasms.

Lista de Figuras

Figura 1 Esquema demosntrando a ampla ação do curcumin _____	27
Figura 2 Morfologia das culturas de CaP PcBra1, PcBra2 e PcBra3 _____	49
Figura 3 Morfologia das culturas de CaB BexBra1, BexBra2 e BexBra4 _____	51
Figura 4 PCR para verificação de contaminação por micoplasma _____	52
Figura 5 Curva de crescimento das linhagens de CaP _____	53
Figura 6 Curva de crescimento das linhagens de CaB _____	54
Figura 7 Estudo imunocitoquímico das linhagens de CaP _____	55
Figura 8 Estudo imunocitoquímico das linhagens de CaB _____	56
Figura 9 Estudo imunocitoquímico das linhagens de CaP demonstrando expressão nuclear de P53 _____	57
Figura 10 Estudo imunocitoquímico das linhagens de CaB, demonstrando expressão nuclear forte e difusa de P53 em BexBra1 (1) e BexBra4 (2). _____	57
Figura 11 Teste de FISH das linhagens de CaP _____	60
Figura 12 Teste de FISH da linhagem BexBra1 _____	62
Figura 13 Teste de FISH das linhagens BexBra2 e BexBra4 _____	62
Figura 14 Efeito do curcumin na viabilidade de células tumorais das linhagens BexBra1, PcBra1 e LNCaP _____	65
Figura 15 Efeito do curcumin sobre a viabilidade celular de PcBra1 _____	66
Figura 16 Efeito do curcumin sobre a viabilidade celular de PcBra2 _____	67
Figura 17 Efeito do curcumin sobre a viabilidade celular de PcBra3 _____	67
Figura 18 Efeito do curcumin sobre viabilidade celular de BexBra1 _____	68
Figura 19 Efeito do curcumin sobre viabilidade celular na linhagem BexBra2 _____	69
Figura 20 Efeito do curcumin sobre a viabilidade celular de BexBra4 _____	69
Figura 21 Efeito de Prima-1 na linhagem BexBra1 _____	70
Figura 22 Efeito de Prima-1 na linhagem BexBra4 _____	71
Figura 23 Efeito de Prima-1 na linhagem BexBra2 _____	71
Figura 24 Crescimento tumoral <i>in vivo</i> no subcutâneo da região dorsal de camundongo atímico da linhagem comercial LNCaP 6 semanas após a inoculação _____	72
Figura 25 Microfotografia representando crescimento tumoral <i>in vivo</i> de implante subcutâneo de células da linhagem comercial LNCaP _____	73
Figura 26 Heterogeneidade das vias envolvidas na inativação de p53 em cânceres humanos _____	86

Lista de Tabelas

Tabela 1 Linhagens humanas de CaP disponíveis no ATCC _____	17
Tabela 2 Linhagens humanas de CaB disponíveis no ATCC _____	18
Tabela 3 Características dos adenocarcinomas da próstata submetidos à cultura _____	34
Tabela 4 Características dos carcinomas uroteliais da bexiga submetidos à cultura _____	34
Tabela 5 Anticorpos utilizados para caracterização das linhagens de CaP e de CaB _____	38
Tabela 6 Seqüência dos oligonucleotídeos e tamanho do produto de amplificação dos exons 5, 7 e 8 do gene <i>p53</i> _____	39
Tabela 7 Características dos experimentos <i>in vivo</i> _____	46
Tabela 8 Características dos três adenocarcinomas primários de próstata submetidos ao cultivo e que mantiveram crescimento adequado _____	48
Tabela 9 Características dos três carcinomas uroteliais da bexiga, submetidos ao cultivo e que mantiveram crescimento adequado _____	50
Tabela 10 Análise cariotípica das linhagens de CaP _____	58
Tabela 11 Análise cariotípica das linhagens de CaB _____	59
Tabela 12 Análise das alterações do gene EGFR nas linhagens de CaP pela técnica de FISH _____	60
Tabela 13 Análise das alterações nos cromossomos 7,17 e 3 e do locus 9p21 pela técnica de FISH nas linhagens de CaB _____	61
Tabela 14 Análise por STR nas linhagens de CaP e de CaB. Diferentes perfis alélicos de expressão entre as linhagens estabelecidas _____	63

Lista de Abreviaturas

ATCC- *American Tissue Cell Culture*

CaB – Câncer de Bexiga

CaP – Câncer de Próstata

CCT – Carcinoma de células transicionais

COX2 – Ciclooxygenase 2

CR – Cistectomia radical

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FISH – Hibridização *in situ* por fluorescência

FITC- Isotiocianato de fluoresceína

IL-6 – Interleucina 6

IKK- Kinase I-KappaB

MMP3 - Metaloproteinase 3

MMP9 – Metaloproteinase 9

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NE – Não especificado

NF-KappaB – Fator de transcrição nuclear Kappa B

NT- Não Tumorigênico

OPN – Osteopontina

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PI – Iodeto de Propídeo

PR – Prostatectomia radical

PSA – Antígeno prostático específico

RTU – Ressecção transuretral

SFB – Soro fetal bovino

T – Tumorigênico

TD- Tempo de duplicação

TNM – Tumor nodes metastasis

TR – Toque retal

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

Sumário

1. Introdução	15
1.1 Importância do desenvolvimento de linhagens celulares	15
1.2 Câncer de próstata	19
1.3 Câncer de bexiga	22
1.4 Tratamento do câncer de próstata e do câncer de bexiga	24
1.4.1 Curcumin	25
1.4.2 Prima-1	28
1.5 Importância dos estudos <i>in vivo</i>	29
2. Objetivos	31
3. Materiais e Métodos	33
3.1 Estabelecimento de linhagens de câncer de próstata e de bexiga	33
3.1.1 Coleta das amostras e manutenção das culturas	33
3.1.2 Caracterização das linhagens tumorais	35
3.1.2.1 Controle dos fibroblastos	35
3.1.2.2 Investigação da contaminação das culturas por micoplasma	36
3.1.2.3 Análise da cinética de crescimento	37
3.1.2.4 Estudos imuno-citoquímicos	37
3.1.2.5 Análise de mutação em <i>p53</i> por seqüenciamento	38
3.1.2.6 Estudos citogenéticos	40
3.1.2.6.1 Análises cariotípicas	40
3.1.2.6.2 Análises das alterações moleculares pela técnica de FISH	41
3.1.2.7 Investigação de contaminação cruzada entre as linhagens estabelecidas	42
3.2 Estudos de quimiossensibilidade	43
3.2.1 Curcumin	43
3.2.2 Prima-1	44
3.3 Avaliação da tumorigenicidade das linhagens de células de carcinoma urotelial da bexiga e de adenocarcinoma de próstata em camundongos atímicos	45
4. Resultados	48
4.1 Estabelecimento das linhagens de câncer de próstata e de bexiga	48
4.1.1 Linhagens de células de adenocarcinoma de próstata	48

4.1.2 Linhagens de carcinoma urotelial de bexiga	50
4.2 Caracterização das linhagens tumorais	52
4.2.1 Controle dos fibroblastos	52
4.2.2 Investigação da contaminação das culturas por micoplasma	52
4.2.3 Análise da cinética de crescimento	53
4.2.4 Análises imunocitoquímicas	54
4.2.5 Análises de alterações em <i>p53</i>	57
4.2.5.1 Análise protéica	57
4.2.5.2 Análise gênica	58
4.2.6 Estudos citogenéticos	58
4.2.6.1 Análises cariotípicas	58
4.2.6.2 Análises das alterações genéticas pela técnica de FISH	59
4.2.6.2.1 Análises das alterações do EGFR nas linhagens de CaP	59
4.2.6.2.2 Análises das alterações nos cromossomos 7,17 e 3 e do locus 9p21 nas linhagens de CaB	61
4.2.7 Investigação de contaminação cruzada entre as linhagens estabelecidas	63
4.3 Estudos de quimiossensibilidade por citometria de fluxo	64
4.3.1 Curcumin	64
4.3.2 Estudos de quimiossensibilidade por viabilidade celular	66
4.3.2.1 Curcumin	66
4.3.2.2 Prima-1	70
4.4 Avaliação da tumorigenicidade de linhagens de células de carcinoma urotelial da bexiga e de adenocarcinoma de próstata em camundongos atímicos	72
5. Discussão	75
6. Conclusões	90
7. Apêndice	

Introdução

1. Introdução

1.1 Importância do desenvolvimento de linhagens celulares

A história da cultura de células se iniciou com Ross Harrison, que em 1907 demonstrou a geração de fibras nervosas em explantes de tecido neural de embriões de sapo, cultivados em câmara fechada contendo linfa. A partir de 1940, Earle e cols. desenvolveram a primeira linhagem contínua através do congelamento indefinido de células em nitrogênio líquido. Desde 1970, têm sido descritos métodos para proporcionar um crescimento de células especializadas *in vitro*, incluindo fatores de crescimento, moléculas de adesão, glicoproteínas da matriz extracelular e hormônios (Davis, 2004).

Nos últimos 20 anos a cultura de células *in vitro* passou de um mero instrumento de pesquisa para uma poderosa ferramenta no desenvolvimento da biotecnologia. Aplicações como órgãos artificiais e a substituição de ensaios *in vivo* em experimentos toxicológicos têm tornado a cultura de células uma necessidade junto ao meio científico. O hibridoma é um excelente modelo de sua aplicação, pois permite a produção em larga escala de anticorpos monoclonais, substituindo a necessidade do uso de animais. A cultura de células epidérmicas para o tratamento de queimados ou lesões ulcerosas extensas também já está em uso, assim como a de urotélio para a correção de defeitos congênitos do sistema urogenital. O cultivo *in vitro* de células embrionárias destaca-se como uma importante ferramenta tecnológica para o estudo de inúmeros mecanismos que ocorrem, *in vivo*, em diferentes organismos como plantas e seres humanos. Desta forma, a cultura de células permite o acompanhamento do desenvolvimento e diferenciação celular, estudo dos mecanismos bioquímicos e manipulação genética (Zang et al.,1995).

É importante ressaltar que estes modelos *in vitro* devem ser bem caracterizados para assegurar a validade e reprodutibilidade dos resultados experimentais.

Um dos principais obstáculos para compreensão dos eventos biológicos envolvidos no câncer é a falta de modelos adequados para o estudo *in vitro* em especial em relação ao câncer de próstata (CaP) e ao câncer de bexiga (CaB).

Há um número limitado de linhagens celulares de CaP (Tabela 1), as mais comumente usadas são PC-3, DU-145, LNCaP (Stone et al., 1978, Kaighn et al., 1979) as quais estão disponíveis na Coleção Americana de Culturas de Tecido (ATCC, do inglês *American Tissue Cell Culture*), banco privado de recursos biológicos o qual viabiliza a aquisição, autenticação, produção e desenvolvimento de microorganismos, linhagens celulares e outros materiais utilizados em pesquisas. Outras linhagens foram obtidas a partir de agentes imortalizantes virais limitando seu uso em estudos devido à presença do DNA viral (Schwab et al., 2000).

Tabela 1 - Linhagens humanas de CaP disponíveis no ATCC

Diagnóstico	Nomenclatura	Sítio	TD	Tumorigenicidade	Observação
Carcinoma	PC-3	Osso	NE	T	
Carcinoma	LNCaP clone FGC	Linfonodo supraclavicular	34h	T	Hormônio sensível
Carcinoma	CA-HPV-10	Primário	NE	NT	Transfecção de HPV
Célula epitelial normal	PZ-HPV-7	Zona periférica	NE	NT	Transfecção por hpv-18
Carcinoma	MDA PCa 2b	Osso	NE	T	Andrógeno independente
Carcinoma	22Rv1	Xenotransplante	40h	T	Andrógeno dependente
Célula epitelial normal	WPE1-NA22	Zona periférica	32h	T	Transfecção de HPV-18
Célula epitelial normal	WPE1-NB14	Zona periférica	38h	T	Transfecção de HPV-18
Célula epitelial normal	WPE1-NB11	Zona periférica	29h	T	Transfecção de HPV-18
Célula epitelial normal	WPE1-NB26	Zona periférica	29h	T	Transfecção de HPV-18
Célula epitelial normal	RWPE2-W99	Zona periférica	36h	T	Transformação com K-ras
Carcinoma	VCaP	Osso	53h	T	Andrógeno independente
Célula epitelial normal	WPE-stem	Zona periférica	24h	NT	Transfecção de HPV-18
Célula epitelial normal	WPE-int	Zona periférica	52h	NT	Transfecção de HPV-18
Célula epitelial normal	WPE1-NB26-64	Zona periférica	19h	T	Transfecção de HPV-18
Célula epitelial normal	WPE1-NB26-65	Zona periférica	23h	T	Transfecção de HPV-18
Carcinoma de pequenas células	NCI-H660	Linfonodo	NE	NT	Diferenciação neuroendócrina
Célula epitelial normal	RWPE-1	Zona periférica	NE	NT	Transfecção de HPV-18
Célula epitelial normal	RWPE-2	Zona periférica	NE	T	Transfecção de HPV-18
Célula epitelial normal	PWR-1E	Zona periférica	NE	NT	Transfecção de SV40
Carcinoma	DU 145	Sistema nervoso central	NE	T	Hormônio sensível

*ATCC: American Tissue Cell Culture

*CaP: Câncer de próstata

*TD: Tempo de duplicação

*NE: Não especificado

*NT: Não tumorigênica

*T: Tumorigênica

Cerca de 50 linhagens de CaB foram estabelecidas até agora, sendo a maioria proveniente de tumores invasivos e metastáticos. Duas destas linhagens, T24 e 253J, auxiliaram na elucidação dos eventos relacionados à disseminação metastática do CaB. Entretanto, há poucos modelos de linhagens oriundas de tumores não invasivos (Hatina et al., 2008), conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Linhagens humanas de CaB disponíveis no ATCC

Diagnóstico	Nomenclatura	Sítio	TD	Tumorigenicidade	Observação
Carcinoma	Hs 195.T CRL-7150*	Bexiga	NE	NE	
Carcinoma	Hs 228.T CRL-7193*	Bexiga	NE	NE	
Carcinoma	Hs 172.T CRL-7833	Bexiga	NE	NE	
Carcinoma	5637 HTB-9	Bexiga	NE	T	Grau II
Carcinoma	HT-1376 CRL-1472	Bexiga	NE	T	Grau III
Carcinoma	HT-1197 CRL-1473	Bexiga	NE	T	
CCT	UM-UC-3 CRL-1749	Bexiga	NE	T	
CCT	SW 780 CRL-2169	Bexiga	38h	T	
CCT	J82 HTB-1	Bexiga	NE	T	
Carcinoma de células escamosas 3	SCaBER HTB-3	Bexiga	NE	T	
CTT	T24 HTB-4	Bexiga	NE	T	
CTT	TCCSUP HTB-5	Bexiga	NE	NE	Grau IV
Papiloma	RT4 HTB-2	Bexiga	NE	T	

*ATCC: *American Tissue Cell Culture*

*CaB: Câncer de bexiga

*CCT: Carcinoma de células transicionais

*TD: Tempo de duplicação

*NE: Não especificado

*T: Tumorigênica

Sabe-se ainda, que existem diferenças étnicas entre as populações quanto ao comportamento de neoplasias e a pesquisa baseada em linhagens de uma única população seria fonte de resultados limitados, não contemplando a diversidade que sabidamente ocorre entre os diferentes grupos. Além desse aspecto, as linhagens celulares comerciais são na sua maioria adquiridas no ATCC que apesar de serem

bem padronizadas, requerem processos de importação com aumento do custo e demandas burocráticas que dificultam a pesquisa. Por isso consideramos vital para a compreensão dos fenômenos relacionados à carcinogênese, assim como estudos de resistência a drogas, quimioprevenção e novas estratégias terapêuticas, o desenvolvimento de linhagens tumorais derivadas de tumores primários que acometem a nossa população, peculiarmente miscigenada.

1.2 Câncer de próstata

O CaP constitui a segunda causa de óbito por câncer, perdendo apenas para os tumores de pulmão. Para 2008, foram estimados 186.320 novos casos e 28.660 óbitos pela doença nos Estados Unidos (Jemal et al., 2008). Estimativas brasileiras reportam 49.530 novos casos para 2008, correspondendo a 28% de todos os tumores malignos não cutâneos do homem. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CaP é o mais freqüente em todas as regiões constituindo a segunda causa de óbito, após o câncer de pulmão. A taxa bruta de mortalidade cresceu de 3,73/100.000 homens em 1979 para 8,93/100.000 em 1999, representando uma elevação relativa de 139% (Brasil, 2008).

A incidência do CaP varia amplamente entre os diferentes países e grupos étnicos. Os menores índices estão na China e em partes da região Asiática sendo a América do Norte e a Escandinávia as regiões de maior incidência (Parkin et al., 2001). Recentemente foi descrito o aumento da incidência do CaP na China e em outros países asiáticos (Gu, 2000). Segundo diversos autores este aumento deve-se não só aos avanços dos testes diagnósticos, mas também aos fatores comportamentais. Cook e cols. (1999), analisando a incidência do CaP entre imigrantes chineses, japoneses e filipinos e entre seus descendentes nos EUA, demonstraram que a incidência entre os imigrantes nativos era praticamente a metade daquela observada entre chineses, japoneses e filipinos nascidos nos EUA. Estes resultados corroboram com estudo similar realizado por Tsugane e cols.

(1990) e Shimizu e cols. (1991) que demonstraram que o CaP torna-se mais freqüente nas gerações de indivíduos que se mudaram para regiões de maior incidência evidenciando a influência do ambiente. O período de 2000 a 2004 revelou uma discrepância considerável entre brancos e negros acometidos por esta neoplasia nos EUA. A média da incidência anual da doença (em 100.000 habitantes) foi de 16,0% e 26,6% respectivamente. Há ainda dados bem documentados sobre diferenças na freqüência do CaP entre caucasóides, nativos do Alaska e índios dos EUA (Powell, 1998). Homero e cols. (2003), ao avaliarem as características antropométricas e os níveis séricos de PSA em um grupo de índios que vivem na Amazônia, demonstraram que mudanças nutricionais decorrentes do contato com a civilização, como substituição da caça e fibras vegetais por alimentos mais calóricos, estão aumentando a freqüência de sobrepeso na comunidade indígena, presumindo-se aumento no número de casos da neoplasia prostática, visto que vários de seus membros já apresentam altos níveis séricos de PSA.

Em relação à taxa de mortalidade pelo CaP, os índices demonstram 25.6 entre os brancos, e 62.3 entre os negros (American Cancer Society, 2008). Inúmeras razões têm sido propostas para explicar essas diferenças como o fato de homens negros apresentarem uma maior prevalência, bem como um mau prognóstico em relação à diferenciação tumoral e a invasão do câncer. Dentre essas razões, fatores nutricionais, hormonais e polimorfismos genéticos poderiam explicar a maior prevalência e o fenótipo mais agressivo observado entre negros (Boyle et al., 2003; Giovannucci et al., 2007).

A idade, a hereditariedade e o estilo de vida são os principais fatores de risco para o CaP, que excepcionalmente ocorre antes dos 40 e que possui incidência aumentada após os 50 anos (Roehl et al., 2006).

A dieta tem sido apontada em alguns estudos como fator importante na etiologia desse tipo de câncer. Uma alimentação baseada em gordura animal, carne vermelha e cálcio tem sido associada ao aumento no risco de desenvolvimento do CaP. Já uma dieta rica em vegetais, selênio, vitaminas D e E, licopeno e ômega-3 tem indicado proteção para o desenvolvimento dessa neoplasia. Alguns estudos

apontam a obesidade como um fator de risco para a mortalidade por CaP (Giovannucci E, 2005; Giovannucci E, 2006; Moorthy, Venugopal, 2008).

O CaP hereditário corresponde entre 10-20% dos casos, e esta possibilidade aumenta quanto menor a idade de manifestação da doença. Possivelmente a característica clínica mais proeminente do CaP nos pacientes com antecedentes familiares é a sua manifestação precoce, cerca de 6 a 7 anos mais cedo do que naqueles sem antecedentes familiares da doença (Roehl et al., 2006).

Atualmente a detecção precoce do CaP é feita pelo exame de toque retal (TR) e determinação da concentração sérica do antígeno prostático específico, o PSA (Carter; Pearson, 1999). No entanto, o PSA é um marcador do tecido prostático, mas não específico do CaP (Mistry; Cable, 2003). Sendo assim, e com os avanços do conhecimento sobre a biologia do CaP, observamos uma necessidade cada vez maior da descoberta de novos marcadores que possam fornecer uma maior exatidão no diagnóstico (Jonathan et al., 2007).

O prognóstico depende principalmente do estágio TNM (*tumor nodes metastasi*), grau histológico de Gleason bem como do nível e taxa de progressão do PSA. A progressão do CaP é variada; existem tumores de baixo grau que têm evolução indolente enquanto outros possuem alta capacidade de progressão (Andriole et al., 2005). Existem cinco padrões na escala de graduação de Gleason para o CaP levando-se em consideração o padrão glandular e a sua relação com o estroma prostático. O diagnóstico final é dado pela soma dos valores dos dois focos neoplásicos mais representativos do tumor, de forma que as neoplasias são classificadas em um escore de 2 a 10 (Gleason D.F, 1992; Epstein et al., 2005). Esta graduação é o fator prognóstico isolado mais importante no CaP e fundamental para escolha da terapia.

1.3 Câncer de bexiga

O CaB é a quarta neoplasia mais comum entre os homens nos EUA. Foram estimados em 2004, 50 mil novos casos e 10 mil mortes para 2006 (Madeb; Messing, 2004). No Brasil, o CaB representa 3% do total de carcinomas existentes na população, representando a segunda maior incidência de tumores urológicos, logo após o CaP (Srougi, 2000). Diferentemente do CaP, o CaB é raramente um achado incidental em autópsias; em algum momento de sua história natural, se manifestarão clinicamente e serão diagnosticados.

A proporção de casos de neoplasia vesical entre homens e mulheres é de 3:1. Apesar da prevalência maior no sexo masculino, a mortalidade é cerca de 40% menor neste grupo, pois a doença tem chance 32% maior de ser diagnosticada em estágios iniciais, em relação aos casos no sexo feminino. Isto se deve ao retardo do diagnóstico pela confusão dos sintomas iniciais como hematúria e irritação vesical com infecção do trato urinário comum entre as mulheres. Outro fator que talvez possa contribuir para este fenômeno é o anatômico, pois nos homens a presença da próstata e do músculo detrusor espessado dificulta a disseminação da neoplasia (Robbins, 2004).

Etnia e idade são outras variáveis importantes na epidemiologia do CaB. Negros têm o dobro de chance de desenvolver o carcinoma em relação aos brancos. Além disso, os negros possuem maiores índices de disseminação do câncer e menor taxa de sobrevida. Diferenças no processo de metabolização dos carcinógenos relacionados à doença podem ser uma das razões que expliquem essas diferenças étnicas (Montironi et al., 2003).

Cerca de 70 a 80% dos novos casos de CaB são classificados como superficiais (pTa ou pT1) os quais apresentam probabilidade de recidiva, mas em 80% dos casos, permanecem confinados à mucosa e submucosa (Metts et al., 2000). Os tumores de baixo grau e do tipo papilíferos apresentam alterações no cromossomo 9, na proteína reguladora do ciclo celular, ciclina D1, e no receptor do fator de crescimento de fibroblasto, FGFR3. Apresentam ainda uma produção

excessiva do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), promotor da angiogenese. Por outro lado, alterações nas proteínas reguladoras P53 e Rb são comumente identificadas no carcinoma *in situ* e em formas invasivas do CaB (Gontero et al., 2001).

Alguns fatores de risco que predispõem ao CaB já se encontram bem definidos como o tabagismo, a exposição ocupacional a aminas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, ambos utilizados nas indústrias têxtil de corantes e de borracha. O uso de medicamentos como a ciclofosfamida e a fenacetina, as infecções crônicas e a exposição à radiação ionizante têm sido relacionadas ao desenvolvimento do CaB (Madeb; Messing, 2004).

O tabagismo é o principal fator de risco, responsável por 60% dos tumores masculinos e 25% dos femininos (Marcus et al., 2000). O período correspondente ao consumo de cigarros é a principal característica atribuída a este fator. Indivíduos que param de fumar apresentam uma redução na probabilidade de desenvolver a doença. Após 1 a 4 anos de abstinência, um ex-fumante apresenta uma redução no risco em cerca de 40% entretanto, após 25 anos de abstinência um ex-fumante ainda apresenta índices bem maiores do que o da população geral no que se refere ao desenvolvimento do tumor. Das substâncias encontradas no cigarro, as nitrosaminas e as 2-naftilaminas apresentam efeito carcinogênico conhecido sobre o urotélio. Já o 4-aminobifenil e o benzopireno são metabolizados por enzimas hepáticas, produzindo compostos com alta afinidade pela molécula de DNA e que, portanto, tornam-se agentes mutagênicos em potencial (Madeb; Messing, 2004).

A detecção precoce é a melhor forma para se obter uma maior probabilidade de cura, evitar o desenvolvimento de metástases e prolongar o tempo de vida. Desta maneira a maioria dos cânceres de bexiga identificada precocemente apresenta um bom prognóstico ao contrário daqueles detectados em uma fase mais avançada da doença na qual o tumor já adquiriu capacidade de invasão (Theodorescu, 2003).

A citoscopia com biópsia, método invasivo, e a citologia oncótica da urina, pouco sensível, constituem o padrão ouro para o diagnóstico do CaB (Halling, 2003). A elevada taxa de recorrência de tumores superficiais juntamente com resultados

equivocados obtidos da citologia urinária bem como da utilidade limitada deste método na detecção de tumores de baixo grau (Pycha et al., 2004; Varella-Garcia et al., 2004), fazem da citoscopia com biópsia uma necessidade para o diagnóstico e monitoramento de pacientes que apresentam recorrência e progressão da doença. Sendo assim novos métodos de diagnóstico não invasivo tal como a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) são considerados promissores (Mercedes et al., 2007).

1.4 Tratamento do câncer de próstata e do câncer de bexiga

Embora pacientes com diagnóstico precoce do CaP possam usufruir de uma variedade de opções de tratamento, a intervenção terapêutica a longo prazo está associada com conseqüências adversas freqüentes (Leonard et al., 2009). A incontinência urinária, sangramento, a toxicidade gastrointestinal e a disfunção erétil são os efeitos secundários mais relatados decorrentes dos diferentes tratamentos do CaP localizado, que podem incluir radioterapia, prostatectomia radical, crioterapia, braquiterapia e o bloqueio hormonal (Jemal et al., 2008). O uso da terapia hormonal tem sido acompanhado por complicações como a osteoporose e aumento dos riscos de doenças cardiovasculares (Kumar et al., 2005). As conseqüências adversas do tratamento do CaP podem afetar o paciente em algum momento durante a terapia, sendo que opções mais agressivas aumentam a probabilidade de complicações e dos efeitos secundários (Gomella, 2007). A maioria das terapias combinadas culmina com uma significativa redução da qualidade de vida do paciente, como pode ser observado na radioterapia combinada a braquiterapia (Wu et al., 2008). Além dos efeitos adversos que interferem na qualidade de vida dos pacientes, este tipo de tratamento gera custos elevados para os sistemas de saúde com ganhos nem sempre satisfatórios para os pacientes.

Apesar da maioria dos pacientes apresentarem CaB não invasivo, os índices de recidiva e progressão são altos sendo necessário um monitoramento freqüente e a longo prazo. Dependendo da agressividade do tumor, recomenda-se a

quimioterapia intravesical ou imunoterapia após a ressecção transuretral da bexiga (RTU). Atualmente agentes alquilantes como a mitomicina e diferentes cepas do *Bacilo Calmette-Guérin* (BCG) são tidos como tratamento de escolha (Babjuk et al. 2008). Esses dois tipos de terapia apresentam melhor efetividade quando comparados a outros agentes como interferon- γ e a quimioterapia com antraciclina no que se refere à diminuição das taxas de recorrência tumoral, entretanto, a ação destes compostos na progressão do CaB invasivo ainda é incerta. É importante ressaltar que estas modalidades terapêuticas apresentam alta taxa de toxicidade, acarretando 3% de mortalidade (Sievert et al., 2009).

Em vista do exposto, a descoberta de novas drogas é amplamente desejada para o tratamento do CaP e do CaB.

1.4.1 Curcumin

O curcumin é um dos agentes quimiopreventivos mais estudados, é um composto natural extraído da *Curcuma longa* Lin. (planta herbácea originária da Índia e introduzida no Brasil pelos colonizadores, produtora de rizomas tradicionalmente conhecidos; considerada uma preciosa especiaria por compor famosos temperos, entre eles o “curry”) que promove a supressão e regressão da carcinogênese (Jiang et al., 1996). Inúmeras pesquisas realizadas nos últimos 50 anos demonstraram que este composto pode auxiliar no tratamento e prevenção do câncer. Seu potencial anticancerígeno é atribuído a sua capacidade em suprimir a proliferação de diversas células tumorais regulando negativamente os fatores de transcrição AP-1 (Singh; Khar, 2006), NF-KappaB, ativado via Kinase I-KappaB (IKK) (Aggarwal et al., 2004).

A inibição do crescimento de inúmeras células tumorais como carcinomas de mama, do rim, fígado, pele (carcinoma basocelular), melanoma, carcinoma de próstata (Gomez-Lechon et al., 2002) tem sido atribuída ao curcumin. Este composto também suprime a proliferação de algumas células normais, como hepatócitos,

células epiteliais (Ozaki et al., 2000), osteoclastos (Cipriani et al., 2001) e linfócitos T (Huang et al., 1992).

Em vários estudos, o curcumin tem sido descrito como um potencial agente antioxidante e antiinflamatório (Abe et al., 1999; Ramsewak et al., 2000; Literat et al., 2001;).

A inflamação é um importante evento no processo tumorigênico sendo uma de suas principais características a regulação positiva do fator de transcrição nuclear Kappa B (NF-KappaB). NF-KappaB se une ao DNA promovendo a transcrição de genes inflamatórios, anti-apoptóticos, indutores da proliferação celular e angiogenese (Philip et al., 2004), propiciando a tumorigênese através da ativação da osteopontina (OPN) (Viatour et al., 2005). O curcumin bloqueia a sinalização do NF-KappaB e inibe a ativação da IKK, suprimindo a proliferação e sobrevivência de várias células através dos mediadores Bcl-2, ciclina D1, IL-6, COX2 e MMP-9 reduzindo os processos de invasão e metástase de tumores (Gao et al., 2004). Efeitos imunoinflamatórios como ativação de macrófagos e células *natural killer* e funções moduladas por linfócitos também são atribuídas ao curcumin (Morin et al., 2001).

A atividade mitocondrial exerce um importante papel no processo apoptótico. Morin e cols. (2001) demonstraram que o curcumin aumenta a permeabilidade da membrana mitocondrial de hepatócitos de camundongos, junto ao poro de transição promovendo a apoptose.

A angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, é uma importante etapa do processo metastático. O curcumin apresenta atividade anti-angiogênica por regular negativamente a expressão de genes pró-angiogênicos como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), angiopoetina, MMP9 e MMP3 (Hahm et al., 2004).

A quimioprevenção é descrita como o uso de compostos naturais e sintéticos que promovem a supressão ou retardo da carcinogênese (Jiang et al., 1996). Produtos quimiopreventivos apresentam pequenos efeitos colaterais e tóxicos, além de neutralizarem os carcinógenos e seus efeitos sobre as células. A maioria dos agentes quimiopreventivos conhecidos são extratos de plantas os quais inibem a

proliferação de células malignas durante as etapas de promoção e progressão da carcinogênese.

Com base nas evidências apresentadas, resumidas na figura abaixo, pode-se dizer que o curcumin poderia funcionar como um agente antitumoral por suprimir a iniciação, promoção e progressão de neoplasias.

Figura 1. Esquema demonstrando a ampla atuação do curcumin em diferentes moléculas implicadas no processo da carcinogênese

1.4.2 Prima-1

Prima-1 é um composto químico que tem a capacidade de suprimir o crescimento celular em linhagens que exibem mutação em *p53*. Esta pequena molécula de peso molecular de 185kd restaura seqüências específicas de ligação de *p53* com o DNA recuperando a conformação funcional da proteína P53 gerada pelo gene mutado, restaurando sua atividade transcricional (Bykov et al., 2002).

P53 liga-se a seqüências específicas do DNA sendo um fator de transcrição que controla de forma positiva ou negativa a expressão de diversos genes envolvidos em várias vias da sinalização celular. Dentre as mais importantes está a via de replicação do DNA, na qual P53 é responsável pelo controle durante a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S e também da fase G2 para fase M, garantindo a manutenção da integridade do genoma e o controle da proliferação celular (El-Deiry, 1998). Exerce ainda, papel fundamental na indução da apoptose e reparo do DNA (Asker et al., 1999).

Estudos demonstram que Prima-1 promove a inibição do crescimento de células tumorais que expressam *p53* mutado, o que não é observado em células deficientes em *p53* ou naquelas que possuem a forma selvagem (Wang et al., 2007). Os mecanismos responsáveis por esta atividade preferencial de Prima-1 sobre as células *p53* mutadas e as vias envolvidas na morte celular são desconhecidos. Aparentemente Prima-1 ativa a transcrição de genes que atuam na cascata de *p53* tais como, WAF1, Bclx e PUMA envolvidos na inibição do ciclo celular e indução da apoptose (Bykov et al., 2003 ;Wang et al., 2007).

1.5 Importância dos estudos *in vivo*

O estudo *in vivo* é uma importante ferramenta utilizada na pesquisa biológica antes que estudos clínicos sejam realizados no homem.

Estudos com animais são normalmente os primeiros estudos *in vivo* a serem realizados com um medicamento ou terapia, para determinar os efeitos de substâncias diversas e seus limites de segurança. Além disso, o estudo *in vivo* permite a análise dos processos bioquímicos e fisiológicos, e de inúmeros eventos comportamentais (Janssen, 2002).

Ainda que a realização desses estudos esteja sujeitos à intensa discussão ética, é inegável que eles são uma etapa necessária antes da realização de testes em seres humanos.

Camundongos são uns dos principais exemplos de cobaias utilizadas nos estudos *in vivo* devido ao seu pequeno tamanho, facilidade de manuseio, baixo custo de manutenção e período de vida curto. Diversos estudos demonstram que os mecanismos fisiológicos dos camundongos são semelhantes aos observados em humanos, o que torna interessante o seu emprego em pesquisas, permitindo a realização de experimentos de manipulação genética estudando-se *in vivo* genes humanos (Janssen, 2002).

Objetivos

2. Objetivos

Objetivo primário

Estabelecer e caracterizar linhagens de carcinoma de próstata e carcinoma urotelial da bexiga para estudos *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos secundários

Caracterização das linhagens obtidas através da análise da cinética de crescimento, análises imunocitoquímicas e análises citogenéticas.

Realizar estudos de quimiossensibilidade utilizando-se os compostos curcumin e Prima-1.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 Estabelecimento de linhagens de câncer de próstata e de bexiga

3.1.1 Coleta das amostras e manutenção das culturas

Fragmentos de carcinoma urotelial da bexiga e de adenocarcinoma da próstata, cujas características estão expostas nas Tabelas 3 e 4, foram obtidos durante cirurgia para remoção de tumores primários de pacientes tratados e acompanhados na Divisão de Urologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e no Hospital Sírio Libanês. Após extração, os fragmentos foram colocados em meio de cultura estéril (RPMI-1640), contendo 200U/mL de penicilina G potássica e 200mg/mL de sulfato de estreptomicina (Sigma Co, St. Louis, MO, EUA). As amostras tumorais foram, então, transferidas para placas de Petri estéreis, pesadas, medidas e fragmentadas com bisturi. Os fragmentos foram submetidos à digestão enzimática com collagenase tipo VIII (0,56mg/mL; Sigma, St. Louis, MO, EUA) em 10 mL de meio de cultura RMI-1640 por grama tecido, durante 90-120 min, a 37°C com agitação contínua. Posteriormente, o material digerido foi filtrado em gaze estéril para remoção dos restos teciduais não digeridos. As suspensões celulares obtidas foram lavadas duas vezes com cerca de 20 mL de meio RPMI-1640 e centrifugadas em centrífuga refrigerada Eppendorf a 150 g por 10 min a 4°C sendo quantificadas em câmara de Neubauer. As células tumorais recuperadas (1×10^6 células/frasco) foram colocadas em frascos de cultura de 25 cm³ contendo RPMI-1640, suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% e solução antibiótica e antimicótica (Sigma Co, St. Louis, MO, EUA) a 1%. Os frascos foram incubados em estufa para cultura de células de CO₂ á 37°C. O meio de cultivo era trocado quando a subconfluência da monocamada celular atingia 70% (Davis, 2004).

Tabela 3- Características dos adenocarcinomas da próstata submetidos à cultura

Cultura	Idade	Tumor	Via de ressecção	Grau de Gleason	Estádio	Data
PcBra1	62	primário	RTU	9 (4+5)	Avançado obstrutivo	Ago/06
PcBra2	53	primário	PR	6 (3+3)	pT2Nx	Nov/06
PcBra3	50	primário	PR	8 (4+4)	pT3Nx	Nov/06
PcBra4	69	primário	PR	8 (4+4)	pT3Nx	Dez/06
PcBra5	50	primário	PR	8 (4+4)	pT3Nx	Mar/07
PcBra6	60	primário	PR	8 (4+4)	pT3N1	Abr/07

RTU – Ressecção transuretral

PR – Prostatectomia radical

Tabela 4- Características dos carcinomas uroteliais da bexiga submetidos à cultura

Cultura	Idade	Via de ressecção	Grau Histológico	Estádio	Data
BexBra1	57	CR	Alto grau	pTis	Jan/06
BexBra2	67	CR	Alto grau	pT3	Jan/07
BexBra3	92	RTU	Alto grau	pT1	Abr/06
BexBra4	51	CR	Alto grau	pT4	Ago/07

RTU – Ressecção transuretral

CR – Cistectomia radical

3.1.2 Caracterização das linhagens tumorais

3.1.2.1 Controle dos fibroblastos

A contaminação de linhagens celulares por fibroblastos é um dos principais problemas enfrentados durante o seu estabelecimento. Testamos duas técnicas descritas para avaliação daquela mais eficiente para este propósito.

a. Espermina

Espermina foi usada para eliminação de fibroblastos em cultura de carcinoma de próstata conforme descrito por Mukta e cols. (1980).

As culturas de CaP foram colocadas em meio RPMI-1640 (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) acrescido de SFB 10% durante 24 h. Após este período o meio foi substituído por RPMI-1640 + SFB 10% + espermina (*Spermine tetrachloride*, Sigma Co, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 2,5 µg/mL. A cada dois dias, o meio de cultura contendo espermina foi trocado e a morfologia celular observada em microscópio invertido de contraste de fase (Eclipse TS100, Nikon).

b. Inanição

O controle do crescimento dos fibroblastos foi feito através da técnica de inanição nutricional conforme descrito por Nayak e cols. (1991).

Células tumorais, cultivadas em meio RPMI suplementado com SFB a 10%, foram expostas a uma redução da concentração de SFB. A redução foi feita gradualmente (de 10% para 1%). O último passo (RPMI suplementado com 1% de SFB) foi mantido até que as células tumorais atingissem o estado de confluência. A partir do crescimento da cultura em meio RPMI suplementado com SFB a 1% prosseguimos com o aumento gradual da concentração de SFB (2,5%, 5% e 10%). Após este processo os fibroblastos remanescentes foram aparentemente eliminados através das diferenças de adesão. Finalmente, as células selecionadas após inanição nutricional foram tripsinizadas, suspensas em 10 mL de meio de cultura (10% de SFB) e incubadas por 15 min (primeiro ciclo). As células que não aderiram

ao final do primeiro ciclo foram transferidas para um novo frasco o qual foi incubado por 15 min (segundo ciclo). Este procedimento foi repetido até que se completassem quatro ciclos. O primeiro frasco continha predominantemente fibroblastos e o último frasco células tumorais. Após esta etapa caso os fibroblastos não tivessem sido totalmente eliminados, repetimos o procedimento a partir do frasco correspondente ao 4º ciclo.

3.1.2.2 Investigação da contaminação das culturas por micoplasma

Para certificação da ausência de contaminação de nossas linhagens pelo micoplasma utilizamos a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com o uso do kit *EZ-PCR Mycoplasma Test* (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) o qual detecta várias espécies de micoplasma (*M. fermentans*, *M. hyorhinitis*, *M. arginini*, *M. orale*, *M. salivarium*, *M. hominis*, *M. pulmonis*, *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. pneumoniae*, *M. pirum* and *M. capricolum*) com elevada sensibilidade e especificidade.

Para tanto, 1 mL de meio de cultura dos frascos contendo células tumorais em crescimento foi transferido para tubo de microcentrifuga de 1,5 mL. O conteúdo foi centrifugado a 250 g por 1 min para remoção de restos celulares, e em seguida transferidos para um novo tubo. Nova centrifugação a 15.000 g por 10 min foi realizada para sedimentação de possível micoplasma contaminante. Posteriormente, a amostra foi suspensa em 50 µL de solução tampão e aquecida a 95°C por 3 min. Em tubo de microcentrifuga de 0,2 mL adicionamos 5 µL da amostra, 10 µL do mix de reação contendo enzimas e oligonucleotídeos e 35 µL de água milliQ. A condição usual de programação dos ciclos do termociclador (9700 *Applied Biosystems*, Foster City, EUA) foi desnaturação inicial a 94°C por 30 s eg, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 60°C por 2 min e 72°C por 1 min. Por fim, 94°C por 30 seg, 60°C por 2 min e 5 min a 72°C.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%. A banda de amplificação é de 270 pb.

3.1.2.3 Análise da cinética de crescimento

Células crescidas em RPMI-1640 acrescido de SFB 10% foram transferidas para placas de 24 poços em uma concentração inicial média de $7,2 \times 10^4$ células por poço. O número de células viáveis (exclusão com azul de tripan) foi estimado diariamente, no mesmo horário até o 5º dia de cultivo. Para o cálculo do tempo de geração (tempo necessário para que a população celular dobre em número) utilizamos as fórmulas descritas abaixo (Davis, 2004).

$$n = (3,32 \log X_f / X_i) / t_f - t_i \text{ e } g = 1/n$$

Sendo:

g = tempo de geração

n = número de gerações por unidade de tempo

X_f = número de células finais

X_i = número de células iniciais

t_f = tempo de cultivo inicial

t_i = tempo de cultivo final

3.1.2.4 Estudos imuno-citoquímicos

Utilizamos a técnica de imuno-citoquímica para confirmação das linhagens estabelecidas através da expressão de antígenos característicos. Quando atingido o estágio de confluência, as células foram descoladas dos frascos de cultura com aparato específico, sem tripsinização, transferidas para tubo falcon e centrifugadas a 150 g por 10 min a 6°C em centrífuga Eppendorf refrigerada. Posteriormente

descartamos o sobrenadante sendo o pellet suspenso em álcool a 70%. Adicionamos 100µL da suspensão celular em lâminas silanizadas as quais foram submetidas à citocentrifugação a 900 rpm por 5 min. Sendo analisadas pela técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase, com o uso dos anticorpos primários descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Anticorpos utilizados para caracterização das linhagens CaP e de CaB

Linhagem	Anticorpo	Marca	Clone	Diluição
CaP	PSA	Dako	ER-PR8	1:50
	PSMA	Santa Cruz	P	1:100
	Receptor androgênico	Dako	AR441	1:50
CaB	Citoqueratina 7	Zymed	OV-TL12/30	1:50
	Vimentina	Dako	V9	1:50
Ambas	Coquetel de citoqueratinas*			1:100
	Desmina	Dako	D33	1:100
	Fator VIII	Dako	F8/86	1:400
	p53	Dako	DO7	1:100

*Coquetel de citoqueratinas corresponde a uma mistura dos anticorpos AE1+AE3 (clone AE1/AE3, 1:400, Dako), CK7 (clone OV-TL12/30, 1:50, Zymed), CK18 (clone DC10, 1:50, Dako), CK20 (clone Ks208, 1:50 Dako), CK14 (clone LL002, 1:100, NovoCastr), utilizado para identificação de carcinomas indiferenciados.

3.1.2.5 Análise de mutação em *p53* por seqüenciamento

Para análise do status de *p53* nas nossas linhagens, procedemos com a amplificação dos exons 5,7 e 8 ,mais comumente mutados, do gene *p53*.

Para extração do DNA genômico das células mantidas em cultivo, foi utilizado o reagente Brazol conforme recomendação do fabricante (*LGC Biotecnology*, BR). Mutações nos exons 5, 7 e 8 foram analisadas pela técnica de seqüenciamento. A seqüência de nucleotídeos dos primers utilizados e a extensão do produto da PCR estão dispostas na Tabela 6. A reação foi preparada em um volume final de 25 µL: 1

μL de cada primer, 0,5 μL de dNTP 10mM, 2,25 μL *Taq* DNA polimerase reaction buffer 1x, 0,07 μL *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen Life Technologies*) 0,35U/ μL, 1,25 μL de MgCl₂ 1,5 mM, 16,43 μL de H₂O_d e 2,5 μL DNA. A reação de PCR foi feita inicialmente, com a desnaturação a 94°C por 4 min seguida por 30-35 ciclos a 94°C, 1 min, 50-55°C (conforme TM dos primers) por 45 seg e 1 min a 72°C.

Tabela 6 - Seqüência dos oligonucleotídeos e tamanho do produto de amplificação dos exons 5, 7 e 8 do gene *p53*

Oligonucleotídeo		Produto da PCR
5F	5'TCTTCCTGCAGTACTCCCCT 3'	205
5R	5' AGCTGCTCACCATCGCTATC 3'	
7F	5' TTGTCTCCTAGGTTGGCTCT 3'	136
7R	5'GCTCCTGACCTGGAGTCTTC 3'	
8F	5' TCCTGAGTAGTGGTAATCTA 3'	157
8R	5' GCTTGCTTACCTCGCTTAGT 3'	

*F: FOWARD

*R: REVERSE

Em seguida realizamos reações necessárias para o seqüenciamento. A reação foi preparada em um volume final de 10 μL sendo usando 0,64 μM de cada primer, 1μL de *Big Dye Terminator* (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA), 2μL de tampão, 1 μL de DNA proveniente da reação de PCR e água MilliQ para completar o volume final . A reação foi feita inicialmente, com a desnaturação a 96°C por 3 min seguida de 36 ciclos a 96°C por 30 seg, 55°C por 15 seg e 4 min a 60°C. Para finalização da corrida à mesma foi estendida por 10 min a 60°C.

Posteriormente, as amostras foram precipitadas com isopropanol 75%, seguido de 15 min de descanso em temperatura ambiente, longe da luz. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 30 min a 4000 rpm a 4°C. Após centrifugação, invertemos a placa para descarte do material e adicionamos 150 μL de etanol 70%. A placa foi novamente centrifugada por 15 min a 4000 rpm a 4°C. Invertemos a placa a qual foi colocada no termociclador a 96°C por 3 min. Para finalizar adicionamos 10μL de formamida.

As reações foram então analisadas no seqüenciador ABI PRISM 3730 *Genetic Analyzer* (*Certified GeneTool*, Milpitas, CA). Os dados gerados foram convertidos em cromatogramas e armazenados no computador acoplado ao

seqüenciador. As seqüências obtidas foram transferidas para um computador e analisadas utilizando o programa *BioEdit* versão 7.0.4.1. Uma vez obtida as seqüências, realizamos comparações com as seqüências do gene *p53* utilizando o banco de dados público, *NCBI*, para identificação de possíveis mutações com o uso da ferramenta BLAST.

3.1.2.6 Estudos citogenéticos

3.1.2.6.1 Análises cariotípicas

Para obtenção de células em metáfase, células tumorais, cultivadas em meio RPMI suplementado com SFB a 10%, foram expostas a uma redução da concentração de SFB. O meio foi trocado por meio RPMI suplementado com SFB a 1% e as células incubadas por 24h. Após este período o meio foi novamente trocado por meio RPMI suplementado com SFB a 20% sendo as células incubadas por 48h para sincronização do ciclo celular. Em seguida, adicionamos 0,1 mL de colchicina 50 µg/mL (Sigma Co, St. Louis, MO, EUA) para cada 1 mL de meio contido nos frascos de cultura incubando as células por um período de 90 min a 37°C. Posteriormente transferimos o meio para um tubo falcon. Adicionamos 150 µL de tripsina para remoção das células restantes, as quais foram transferidas para o mesmo tubo falcon onde foi colocado o meio. Centrifugamos a suspensão celular a 1500 rpm por 6 min. Após descarte do sobrenadante, adicionamos KCl 0,075 M ao precipitado, para choque hipotônico. Incubamos a amostra a 37°C por 20 min e a interrupção do choque foi feita pela adição de 1 mL de solução fixadora (metanol: ácido acético glacial 3:1 v/v). Centrifugamos novamente a suspensão celular a 1500 rpm por 6 min sendo o sobrenadante, descartado. Os três passos anteriores foram repetidos por mais duas vezes. Ao final da 3ª lavagem, aspiramos o sobrenadante deixando apenas 0,5 mL da solução fixadora sobre o precipitado. O pellet foi

suspenso com o auxílio de uma pipeta Pasteur, e sobre uma lâmina umedecida colocamos cerca de uma ou duas gotas da suspensão celular. Por fim, as lâminas foram coradas com Giemsa por 2-3 min e lavadas com água destilada (Rooney, Czepulkowski, 1986). Após secagem das lâminas, analisamos cerca de 20 células em metáfase.

3.1.2.6.2 Análises das alterações moleculares pela técnica de FISH

As linhagens de CaB foram submetidas à análise de aberrações cromossômicas com o uso da sonda Urovysion, que detecta as quatro alterações mais freqüentes e precoces do carcinoma urotelial. Os centrômeros dos cromossomos 3 (CEP 3 - vermelho), 7 (CEP 7 – verde), 17 (CEP 17 – azul) e região do locus 9p21 (LSI 9p21 – amarelo). As linhagens de CaP foram submetidas à pesquisa de alterações no gene EGFR.

A suspensão celular foi obtida através da mesma técnica descrita para o cariótipo. As células foram então fixadas em lâminas de vidro. As lâminas foram desidratadas em etanol 70%, 85% e 100% permanecendo por 2 min em cada concentração. Posteriormente, foram mantidas em banho-maria com tampão SSC 2X (NaCl 3M e $C_6H_8O_7Na_3$ 0,3M, pH 7,5) a 72°C por 10 min, seguido de outro período de 10 min em solução de HCL 10mM acrescida de pepsina 0,5mg/mL (2500-3000U) e proteinase K 0,5mg/mL. Na sequência as lâminas foram lavadas, duas vezes, em *phosphate-buffered saline solution* 1X (PBS) em temperatura ambiente por 5 min, sendo desidratadas novamente com etanol a 70%, 85% e 100%. Posteriormente, foi então adicionado 3µL da sonda Urovysion® (Abbott. Des Plaines, IL) nas linhagens de bexiga e EGFR (Abbott. Des Plaines, IL) nas linhagens de próstata. A sonda foi coberta com lamínula plástica, seguido o processo de co-desnaturação por 8 min a 80°C. Para o processo de hibridização, as lâminas foram incubadas por um período mínimo de 16h em câmara úmida a 37°C sendo lavadas posteriormente, em tampão SSC 0,4X/ NP-40 0,3% a 73°C por 2 min e enxaguadas

em SSC 2X/NP-40 0,1% em temperatura ambiente. Depois da lavagem, foi adicionado 3 μ L do contracorante (DAPI II). As lâminas foram então cobertas com lamínulas de vidro sendo mantidas em geladeira, até o momento da análise.

A análise foi realizada em microscópico de epifluorescência (Nikon – Eclipse E 600) com lâmpada de mercúrio de 100 *watts* e filtros específicos para identificação das sondas utilizadas.

3.1.2.7 Investigação de contaminação cruzada entre as linhagens estabelecidas

Para certificação da ausência de contaminação cruzada entre as linhagens de CaP e de CaB utilizamos a técnica de *short tandem repeats* (STR) com o uso do kit *AmpFISTR Identifiler PCR Amplification*. Para extração do DNA genômico das células mantidas em cultivo, foi utilizado o reagente Brazol conforme recomendação do fabricante (*LGC Biotechnology*, BR). Primeiramente homogeneizamos os tubos do *AmpF /STR PCR Reaction Mix* e o *AmpF /STR Primer Set* em um Vortex por 5 seg, seguindo-se centrifugação por 10 min a 4000 rpm a 4°C. O mix de reação foi preparado em um volume final de 12,5 μ L: 5,25 μ L de *AmpF /STR PCR Reaction Mix*, 2,75 μ L *AmpF/STR Primer Set* e 0,25 μ L de *AmpliTaq Gold DNA Polymerase*. O mix de reação foi distribuído nos tubos de PCR sendo então adicionado 5 μ L de DNA a 0,1ng/ μ L. A reação de PCR foi feita inicialmente, com desnaturação a 95°C por 11 min seguida de 28 ciclos a 94°C, 59°C e 72°C cada um por 1 min. Para finalização da corrida à mesma foi estendida por 60 min a 60°C.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese capilar no analisador genético ABI 3100 (*Applied Biosystems*). Os dados gerados foram analisados no software GeneMapper ID (versão 3.5).

3.2 Estudos de quimiossensibilidade

3.2.1 Curcumin

Células em cultura foram expostas a concentrações crescentes de curcumin (*Alxis Biochemicals*, San Diego, CA, EUA) a 0, 10, 25 e 50 μ M por 24h conforme descrito por Skommer J e col. (2006), para determinação do número de células em apoptose e necrose pela técnica de citometria de fluxo, proposta por Lora e col. (2004). Após contagem total das células em câmara de Neubauer, o número de células foi ajustado para uma concentração final de 1×10^5 /100 μ L em solução tampão (10 mM Hepes/NaOH; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl_2 ; pH=7,4). As células foram incubadas em tubos de propileno, protegidas da luz e mantidas à temperatura ambiente durante 15 min com Anexina V conjugada previamente com 1 μ g/mL de isotiocianato de fluoresceína (FITC) obtido no Laboratório de Imunologia do ICB-USP; São Paulo-SP e iodeto de propídeo (PI) a 15 μ g/mL (*Sigma Chemicals*, St. Louis USA). A detecção da porcentagem de células em apoptose e necrose foi feita em citômetro de fluxo (*Becton Dickinson Immunocytometry System*, San Jose, CA, EUA) conectado a um computador (*Macintosh Apple*, CA, EUA). Foram analisados 10.000 eventos utilizando-se o software *Cell Quest Pro* (*Becton Dickinson Immunocytometry System*, San Jose, CA, EUA). Os resultados de fluorescência foram dispostos em escala logarítmica. A fluorescência verde do FITC foi mensurada a 530 ± 30 nm (detector FL1) e a fluorescência vermelha do PI a 585 ± 42 nm (FL2). A quantificação da expressão dos marcadores de membrana, fosfatidilserina e DNA nuclear, foi estimada pela intensidade média de fluorescência/célula emitida pelos reagentes fluorescentes. Quando utilizada uma dupla marcação, as fluorescências do PI e do FITC foram analisadas utilizando-se compensação de fluorescências para corrigir quaisquer interferências de sinais emitidos pelos mesmos.

A fim de avaliarmos a viabilidade celular, após exposição ao curcumin, procedemos conforme metodologia descrita para Prima-1.

3.2.2 Prima-1

A avaliação da viabilidade celular, após exposição ao Prima-1, foi feita com o uso do azul de trypan. Células cultivadas em meio de cultura RPMI suplementado com SFB 10% foram tratadas com 0,25% de tripsina e 0,02% de EDTA. As células foram semeadas em placas de 6 poços em diferentes concentrações: 1×10^5 , 2×10^5 e 3×10^5 células/mL respectivamente. Após 24h de incubação em estufa de CO₂ à 37°C, retiramos o meio de cultura da primeira fileira da placa e acrescentamos a solução de Prima-1 a 50 µM (volume final de 2mL/poço). Como controle do ensaio, não adicionamos qualquer substância a segunda fileira da placa mantendo as células com 2 mL de meio RPMI acrescido de SFB a 10%. Em seguida, incubamos a placa por mais 24h. Posteriormente, as células aderidas foram removidas das placas de cultura com tripsina/EDTA. A suspensão celular foi lavada com meio RPMI 10%, centrifugada a 4000 rpm por 5 min e suspensa em 1mL de RPMI 10%. As células viáveis foram contadas em microscópio invertido.

3.3 Avaliação da tumorigenicidade das linhagens de células de carcinoma urotelial da bexiga e de adenocarcinoma de próstata em camundongos atímicos

Quando atingido o estágio de confluência as células foram descoladas dos frascos de cultura com aparato específico, sem tripsinização. A suspensão de células foi centrifugada a 150 g por 10 min. Descartado o sobrenadante as células foram suspensas em 5-10 mL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Uma alíquota de 10 µl foi suspensa, adicionado o mesmo volume de azul de trypan, homogeneizado com pipeta e 10 µl transferidos para a câmara de Neubauer. As células viáveis foram contadas em microscópio invertido. Após centrifugação em tubo falcon a 150 g por 10 min, descartamos o sobrenadante e suspendemos as células em SFB para obtenção da concentração de 0,5 a $7,0 \times 10^6/100 \mu\text{L}$. A suspensão de células foi logo em seguida, inoculada no subcutâneo de camundongos atímicos isogênicos BAL/c com o auxílio de seringa hipodérmica de 1 mL (0,38 x 13/ BD Plastipak) e agulha hipodérmica (20 x 40 / BD PrecisionGlide). Acreditando que o tecido subcutâneo é inadequado para o crescimento de tumores pouco agressivos como o carcinoma de próstata, em dois animais procedemos ao implante intraperitoneal. O ambiente intraperitoneal é rico em vasos e nutrientes, assim poderia ser mais propício ao desenvolvimento da neoplasia. O número de camundongos utilizados e as culturas das quais a suspensão de células foi obtida encontra-se descrito na Tabela 7.

Tabela 7- Características dos experimentos *in vivo*

Linhagem	Passagem	Nº de animais	Nº de células	inoculação	Período de observação	Crescimento tumoral
BexBra1	5 ^a	3	1 x 10 ⁶	subcutânea	8 semanas	ausente
PcBra1	1 ^a	6	2 x 10 ⁶	subcutânea	12 semanas	ausente
PcBra2	1 ^a	2	2,5 x 10 ⁶	subcutânea	8 semanas	ausente
PcBra3	2 ^a	4	2,5 x 10 ⁶	subcutânea	8 semanas	ausente
PcBra3	2 ^a	2	5 x 10 ⁶	intraperitoneal	8 semanas	ausente
LNCaP	10 ^a	5	5 x 10 ⁶	subcutânea	8 semanas	presente em 1 camundongo

Resultados

4. Resultados

4.1 Estabelecimento das linhagens de câncer de próstata e de bexiga

4.1.1 Linhagens de células de adenocarcinoma de próstata

Submetemos ao cultivo fragmentos de seis tumores primários, sendo que, após um mês, foi observado o crescimento celular em apenas três culturas. As outras culturas que não se desenvolveram foram descartadas. Permanecemos apenas com as linhagens PcBra1, PcBra2 e PcBra3, cujas características estão resumidas na Tabela 8.

Tabela 8- Características dos três adenocarcinomas primários de próstata submetidos ao cultivo e que mantiveram crescimento adequado

Cultura	Idade	Via de ressecção	Escore de Gleason	Estádio	Data	Passagem	Repique
PcBra1	62	RTU	9 (4+5)	Avançado obstrutivo	Ago/06	9	4
PcBra2	53	PR	6 (3+3)	pT2N0M0	Nov/06	5	3
PcBra3	50	PR	8 (4+4)	pT3N0M0	Nov/06	7	4

RTU – ressecção transuretral

PR – prostatectomia radical

Figura 2- Morfologia das culturas de CaP: PcBra1, PcBra2 e PcBra3. O aspecto morfológico apresentam padrão fibroblástico, fusocelular, notando-se vacuolização intracitoplasmática

4.1.2 Linhagens de carcinoma urotelial de bexiga

De quatro tumores submetidos ao cultivo, estabelecemos três linhagens celulares, BexBra1, BexBra2 e BexBra4, cujas características estão resumidas na Tabela 9.

Tabela 9- Características dos três carcinomas uroteliais da bexiga, submetidos ao cultivo e que mantiveram crescimento adequado

Cultura	Idade	Via de ressecção	Grau histológico	Estádio	Data	Passagem	Repique
BexBra1	57	CR	Alto grau	pTis	Jan/06	5	5
BexBra2	67	CR	Alto grau	pT3	Jan/07	4	5
BexBra4	51	CR	Alto grau	pT4	Ago/07	3	4

*CR: CISTECTOMIA RADICAL

Figura 3- Morfologia das culturas de CaB: BexBra1, BexBra2 e BexBra4.

4.2 Caracterização das linhagens tumorais

4.2.1 Controle dos fibroblastos

Notamos uma toxicidade da espermina às células epiteliais da próstata, que sofreram apoptose, e não resistiram aos tratamentos. Assim, abandonamos esta estratégia e utilizamos a metodologia baseada na restrição nutricional a qual foi aplicada com sucesso, tanto às linhagens de carcinoma urotelial da bexiga quanto ao adenocarcinoma de próstata.

4.2.2 Investigação da contaminação das culturas por micoplasma

Não houve contaminação pela bactéria em nenhuma das nossas linhagens como demonstra a Figura 4.

Figura 4- PCR para verificação de contaminação por micoplasma. Ausência de bandas nas culturas testadas. Banda de 270 pb (controle positivo)

4.2.3 Análise da cinética de crescimento

A Figura 5 apresenta as curvas de crescimento das linhagens de CaP. O tempo de duplicação das mesmas foi de 50 horas, 49 horas e 67 horas respectivamente para PcBra1, PcBra2 e PcBra3.

Figura 5- Curva de crescimento. Células crescidas em RPMI acrescido de SFB 10% foram semeadas em placas de 24 poços. **PcBra1** densidade média de $2,15 \times 10^5$ /poço. **PcBra2** densidade média de $7,0 \times 10^4$ /poço. **PcBra3** densidade média de $4,75 \times 10^4$ /poço. O número de células viáveis foi estimado diariamente até o 5º dia de cultivo

A Figura 6 demonstra as curvas de crescimento para as linhagens de CaB. O tempo de duplicação das linhagens foi de 58 horas, 96 horas e 43 horas para BexBra1, BexBra2 e BexBra4 respectivamente.

Figura 6- Curva de crescimento. Células cultivadas em meio RPMI acrescido de SFB 10% foram semeadas em placas de 24 poços. **BexBra1** densidade média de $2,25 \times 10^4$ /poço. **BexBra2** densidade média de $5,0 \times 10^4$ /poço. **BexBra4** densidade média de $2,9 \times 10^4$ /poço O número de células viáveis foi estimado diariamente até o 5º dia de cultivo

4.2.4 Análises imunocitoquímicas

A expressão de citoqueratinas, pan-citoqueratina para as linhagens de CaP confirmaram o fenótipo epitelial. A expressão forte de citoqueratina 7 confirmou o fenótipo epitelial das linhagens de CaB as quais não apresentaram expressão para vimentina. A negatividade para desmina e fator VIII afastou a possibilidade de contaminação por fibroblastos, miofibroblastos ou células endoteliais, tanto nas linhagens de CaP como nas de CaB. A positividade para anti-PSMA nas linhagens de CaP confirmou sua origem prostática. As células tumorais não demonstraram expressão de PSA ou de receptor de andrógeno. Os resultados estão expostos nas figuras 7 e 8.

Figura 7- Estudo imunocitoquímico das linhagens de CaP. **1.** Expressão do coquetel de citoqueratinas [AE1+AE3 (clone AE1/AE3, 1:400, Dako), CK7 (clone OV-TL12/30, 1:50, Zymed), CK18 (clone DC10, 1:50, Dako), CK20 (clone Ks208, 1:50 Dako), CK14 (clone LL002, 1:100, NovoCastr)] confirma o fenótipo epitelial PcBra1 **(A)**, PcBra2 **(C)** e PcBra3 **(E)**. **2.** A expressão de PSMA confirma a origem prostática PcBra1 **(B)**, PcBra2 **(D)** e PcBra3 **(F)**

Figura 8 – Estudo imunocitoquímico das linhagens de CaB. **A.** Forte expressão de citoqueratina 7 confirmando o fenótipo epitelial e a origem urotelial das células cultivadas. **B.** Ausência de expressão de desmina. BexBra1 (**1**), BexBra2 (**2**) e BexBra4 (**3**)

4.2.5 Análises de alterações em *p53*

4.2.5.1 Análise protéica

A imunoexpressão nuclear de P53 mostrou-se positiva nas três linhagens de CaP (PcBra1, PcBra2 e PcBra3) e nas linhagens de CaB (BexBra1 e BexBra4). A linhagem BexBra2 não apresentou expressão nuclear de P53. Os resultados estão expostos nas figuras 9 e 10.

Figura 9- Estudo imunocitoquímico das linhagens de CaP demonstrando expressão nuclear de P53. PcBra1 (1), PcBra2 (2) e PcBra3 (3).

Figura 10- Estudo imunocitoquímico das linhagens de CaB, demonstrando expressão nuclear forte e difusa de P53 em BexBra1 (1) e BexBra4 (2).

4.2.5.2 Análise gênica

As análises foram feitas em duplicata utilizando produto de PCR independentes, pela técnica de seqüenciamento. Não observamos nenhuma mutação nos exons analisados em nenhuma de nossas linhagens.

4.2.6 Estudos citogenéticos

4.2.6.1 Análises cariotípicas

Analizamos um total de 20 células em metáfase de cada linhagem estabelecida, conforme demonstrado nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10- Análise cariotípica das linhagens de CaP

Linhagem	Nº da Passagem	Nº de cromossomos	% de células em metáfase
PcBra1	7 ^a	46	30
		36	33,3
		38	13,3
		42	10,0
		44	6,7
		40	6,7
PcBra2	6 ^a	46	25,0
		38	25,0
		32	25,0
		38	15,0
		26	10,0
PcBra3	7 ^a	36	45,0
		38	10,0
		28	10,0
		46	10,0
		44	10,0
		32	5,0
		52	5,0
		30	5,0

Tabela 11- Análise cariotípica das linhagens de CaB

Linhagem	Nº da Passagem	Nº de cromossomos	% de células em metáfase
BexBra1	5 ^a	38	50,0
		44	38,8
		42	2,8
		32	2,8
		40	5,6
BexBra2	1 ^a	46	77,7
		36	7,4
		34	7,4
		30	3,7
		42	3,7
BexBra4	3 ^a	44	20,0
		36	20,0
		34	15,0
		30	15,0
		26	10,0
		46	10,0
		28	5,0
		20	5,0

4.2.6.2 Análises das alterações genéticas pela técnica de FISH

4.2.6.2.1 Análises das alterações do EGFR nas linhagens de CaP

Analizamos pela técnica de FISH as linhagens PcBra1, PcBra2 e PcBra3 para identificação de amplificação do gene EGFR. As alterações encontradas estão descritas na Tabela 12 e ilustradas na Figura 11. Na linhagem PcBra1, observamos um aumento do número de cópias do gene, marcado em vermelho, associado a um aumento do número de cromossomos, cujo centrômero está marcado em verde. PcBra2 não apresentou alterações e, em PcBra3, as análises revelaram presença de amplificação para o gene EGFR caracterizado pelo grande número de sinais vermelhos (gene) quando comparado com a marcação centromérica (verde).

Tabela 12 - Análise das alterações do gene EGFR nas linhagens de CaP pela técnica de FISH

Cultura	Passada	Resultado
PcBra1	7 ^a	Poliploidia
PcBra2	6 ^a	Ausência de alterações para EGFR
PcBra3	7 ^a	Amplificação para EGFR

Figura 11- Teste de FISH **(A)** Aumento do número de cópias do gene EGFR, marcado em vermelho, associado a um aumento do número de cromossomos, marcados em verde na linhagem PcBra1. **(B)** Ausência de alterações em PcBra2. **(C)** Amplificação para o gene EGFR caracterizado pelo grande número de sinais vermelhos (gene) quando comparado com a marcação centromérica (verde) na linhagem PcBra3

4.2.6.2 Análises das alterações nos cromossomos 7,17 e 3 e do locus 9p21 nas linhagens de CaB

As linhagens de CaB (BexBra1, BexBra2 e BexBra4) foram submetidas à análise de alterações cromossômicas com o uso da sonda Urovysion, que detecta as quatro alterações mais frequentes e precoces do carcinoma urotelial. Foram utilizadas sondas para os centrômeros dos cromossomos 3 (CEP 3 - vermelho), 7 (CEP 7 – verde), 17 (CEP 17 – azul) e região do locus 9p21 (LSI pp21 – amarelo). Identificamos na linhagem BexBra1 ausência de alterações nesses genes. Curiosamente, o teste realizado no espécime cirúrgico, incluído em parafina do tumor que originou a linhagem, foram identificadas numerosas alterações. A linhagem BexBra2 demonstrou em células isoladas, de núcleos de maior tamanho, um aumento do número de cópias do cromossomo 17. Não identificamos perda do locus 9p21 ou anormalidades nos cromossomos 3 e 7 . Em BexBra4 nenhuma alteração foi identificada. As alterações encontradas estão descritas na Tabela 13.

Tabela 13- Análise das alterações nos cromossomos 7,17 e 3 e do locus 9p21 pela técnica de FISH nas linhagens de CaB

Cultura	Passada	Resultado
BexBra1	5 ^a	Ausência de alterações
BexBra2	1 ^a	Aneoploidia
BexBra4	3 ^a	Ausência de alterações

Figura 12- Teste de FISH realizado em BexBra1 **(A)** Aberrações cromossômicas identificadas em amostra de carcinoma urotelial de alto grau, o qual deu origem a linhagem BexBra1 **(B)** Ausência de alterações nos cromossomos 3, 7, 17 e locus 9p21 na linhagem celular BexBra1.

Figura 13. Teste de FISH **(A)** Células da linhagem BexBra2 demonstrando aumento do número de cópias do cromossomo 17, marcado em azul. Acima a esquerda exemplo de célula normal. **(B)** Ausência de alterações nos cromossomos 3, 7, 17 e locus 9p21 na linhagem celular BexBra4.

4.2.7 Investigação de contaminação cruzada entre as linhagens estabelecidas

As análises revelaram ausência de contaminação cruzada entre as linhagens de CaP (PcBra1, PcBra2 e PcBra3) e as de CaB (BexBra1, BexBra2 e BexBra4). Os resultados estão representados nas Tabelas 14.

Tabela 14- Análise por STR nas linhagens de CaP e de CaB. Diferentes perfis alélicos de expressão entre as linhagens estabelecidas.

STR	PcBra1	PcBra2	PcBra3	BexBra1	BexBra2	BexBra4
D8S1179	13, 14	14, 15	10, 15	13, 14	10, 14	13, 15
D21S11	30.2, 32.2	28, 32	28, 32.2	29, 32.2	31.2, 31.2	30, 32.2
D7S820	8, 12	11, 11	10,12	8, 10	12, 13	10, 12
CSF1PO	13, 13	12, 13	11, 11	10, 11	11, 11	10, 12
D3S1358	16, 17	15, 18	16, 16	14, 15	18, 18	17, 18
TH01	7, 9.3	8, 9.3	6, 7	9.3, 9.3	8, 9.3	6, 9.3
D13S317	8, 11	11, 12	11, 11	11, 11	11, 11	9, 14
D16S539	12, 13	11, 11	9, 13	12, 13	10, 11	9, 12
D2S1338	17, 20	19, 23	20, 24	21, 23	17, 24	17, 23
D19S433	13.2, 14	13, 14	13, 13	12, 13	13, 15.2	15, 16.2
VWA	16, 18	16, 17	15,16	15, 17	16, 17	14, 18
TPOX	11, 11	8, 8	8, 10	8, 8	8, 8	9, 10
D18S51	14, 16	16, 16	12, 16	12, 20	12, 17	13, 17
AMEL	X, Y	X, Y	X, Y	X, Y	X, Y	X, Y
D5S818	12, 12	11, 13	12, 13	11, 12	9, 9	10, 10
FGA	20, 20	21, 24	22.2, 24	20, 25	24, 25	21, 23

4.3 Estudos de quimiossensibilidade por citometria de fluxo

4.3.1 Curcumin

a- Linhagens de CaP

Submetemos a linhagem PcBra1 a tratamento com curcumin (Figura 14). A linhagem PcBra1 apresentou na amostra controle 92,8% de viabilidade, e porcentagens crescentes de células em apoptose (34,2% e 64,2%) com o uso de curcumin a 10 μ M, 25 μ M, respectivamente. Na concentração de 50 μ M, houve indução de apoptose em 49,9% das células e necrose em 48,2%, num total de morte celular de 98,1%.

Para comparação dos resultados, utilizamos uma linhagem tradicional, comercialmente disponível, LNCaP. Nesta linhagem considerando que o experimento controle já apresentava 2,5% de apoptose, as concentrações de 10 μ M e 25 μ M induziram apoptose em 31,4% e 21,9% das células, respectivamente. Na concentração de 50 μ M 87,2% das células sofreram apoptose. Já considerando a apoptose tardia/necrose o que se observou foi de 20,4%, 32,0% e 0% nas concentrações de 10 μ M, 25 μ M e 50 μ M respectivamente, mostrando a semelhança dos resultados.

b- Linhagens de câncer de bexiga

No experimento utilizando a linhagem BexBra1, havia viabilidade de 97,7% das células na amostra controle. Esta viabilidade apresentou uma baixa redução na

presença de curcumin nas concentrações de 10 μ M e 25 μ M, porém com 50 μ M houve indução de apoptose em 56,8% das células.

A.

B.

Figura 14- Efeito do curcumin na viabilidade de células tumorais. Células tumorais (BexBra1, PcBra1 e LNCaP) incubadas com ou sem curcumin por 24h foram marcadas com anexina-V-FITC e iodeto de propídio (PI) seguindo-se análise em citômetro de fluxo. **A.** Representação esquemática dos dados obtidos no experimento utilizando a linhagem PcBra1, sendo: R2= células marcadas com anexina (apoptose), R3 = células marcadas com anexina e PI (apoptose tardia), R4 = células não marcadas (viáveis) e R5= células marcadas com PI (necrose). **B.** Porcentagem de células em apoptose e apoptose tardia/necrose após tratamento com concentrações crescentes de curcumina durante 24h

4.3.2 Estudos de quimiossensibilidade por viabilidade celular

4.3.2.1 Curcumin

a - Linhagens de CaP

Após tratamento com curcumin a 50 μ M, observamos acentuada redução da viabilidade nas três linhagens de CaP. No experimento utilizando a linhagem PcBra1 observamos acentuada redução da viabilidade (2,8% - 5,8% de células viáveis) (Figura 15). Em PcBra2 a redução da viabilidade celular variou entre 5,0% - 10,0% (Figura 16). Na figura 17, correspondente a linhagem PcBra3, observamos redução da viabilidade nas três concentrações celulares testadas (7,1% - 11,8 de células viáveis).

Figura 15- Efeito do curcumin sobre a viabilidade celular de PcBra1. Células em diferentes concentrações (1) 1,0E+05, (2) 2,0E+05 e (3) 3,0E+05 células/mL foram incubadas na presença e na ausência de curcumin. Após 24 h as células foram removidas e o número final de células foi estimado utilizando azul de trypan. A viabilidade celular foi de (1) 5,8%, (2) 3,84% e (3) 2,85%

Figura 16- Efeito do curcumin sobre a viabilidade celular de PcBra2. Células em diferentes concentrações (1) 1,0E+05, (2) 2,0E+05 e (3) 3,0+05 células/mL foram incubadas na presença e na ausência de curcumin. Após 24 h as células foram removidas e o número final de células foi estimado utilizando azul de trypan. A viabilidade celular foi de (1) 10%, (2) 9,09% e (3) 5%

Figura 17- Efeito do curcumin sobre a viabilidade celular de PcBra3. Células em diferentes concentrações (1) 1,0E+05, (2) 2,0E+05 e (3) 3,0+05 células/mL foram incubadas na presença e na ausência de curcumin. Após 24 h as células foram removidas e o número final de células foi estimado utilizando azul de trypan. A viabilidade celular foi de (1) 7%, (2) 11,7% e (3) 10,5%

b-Linhagens de CaB

No experimento utilizando a linhagem BexBra1, houve significativa redução da viabilidade celular nas três concentrações de células testadas (23,07- 45,07%). Entretanto, BexBra2 na segunda concentração de células testada não apresentou redução da viabilidade celular após exposição ao curcumin. Na primeira e terceira concentração a redução foi de 33,3% e 35,7% respectivamente. Em BexBra4 observamos redução da viabilidade entre 26,6- 66,6% (Figuras 18, 19 e 20 respectivamente).

Figura 18- Efeito do curcumin sobre viabilidade celular. BexBra1 foi incubada na presença e na ausência de curcumin nas três diferentes concentrações de células (1) 1.0E+05, (2) 2.0E+05 e (3) 3.0E+05 células/ml. Após 24 h as células foram removidas e o número final de células foi estimado utilizando Azul de Trypan. A viabilidade celular foi de (1) 23,07%, (2) 39,28% e (3) 45,7%

Figura 19- Efeito do curcumin sobre viabilidade celular. BexBra2. As células foram incubadas na presença e na ausência de curcumin nas três diferentes concentrações (1) 1.0×10^5 , (2) 2.0×10^5 e (3) 3.0×10^5 células/ml. Após 24 h as células foram removidas e o número final de células foi estimado utilizando Azul de Trypan. A viabilidade celular foi de (1) 33,3%, (2) 100%, (3) 35,7

Figura 20- Efeito do curcumin sobre a viabilidade celular de BexBra4. As células foram incubada na presença e na ausência de curcumin nas três diferentes concentrações de células (1) 1.0×10^5 , (2) 2.0×10^5 e (3) 3.0×10^5 células/ml. Após 24 h as células foram removidas e o número final de células foi estimado utilizando Azul de Trypan. A viabilidade celular foi de (1) 42,8%, (2) 66,6% e (3) 26,6%

Baseando-se nestes resultados concluímos que o curcumin induz acentuada redução da viabilidade celular em linhagens de CaP e em menor intensidade em linhagens de CaB a $50 \mu\text{M}$ em todas as concentrações de células tumorais testadas.

4.3.2.2 Prima-1

Num primeiro experimento, submetemos as linhagens BexBra1, BexBra2 e BexBra4 a tratamento com Prima-1. No experimento utilizando a linhagem BexBra1, houve uma pequena redução da viabilidade celular (6 - 28% de células viáveis). Em BexBra4 observamos uma redução mais significativa da viabilidade (43% de células viáveis) somente na primeira concentração de células testadas. Entretanto, BexBra2 foi a mais afetada pelo tratamento utilizando Prima-1 com redução da viabilidade celular entre 57 - 83% nas três concentrações testadas. (Figuras 21, 22 e 23 respectivamente).

Figura 21- A figura demonstra a baixa redução de viabilidade celular promovida por Prima-1 a 50µM na linhagem BexBra1. As células foram incubadas na presença e na ausência de Prima-1 a 50µM em três diferentes concentrações de células (1) 1.0E+05, (2) 2.0E+05 e (3) 3.0E+05 células/ml. Após 24 h as células foram removidas e o número de células foi avaliado utilizando o Azul de Trypan. A viabilidade celular foi de (1) 92%, (2) 71.5% e (3) 94.4%

Figura 22- A figura demonstra da mesma forma a pequena diferença na viabilidade celular com ou sem Prima- 1 a 50µM na linhagem BexBra4. As células foram incubadas na presença e na ausência de Prima-1 nas três diferentes concentrações de células (1) 1.0E+05, (2) 2.0E+05 e (3) 3.0+05 células/ml. Após 24 h as células foram removidas e o número final de células foi estimado utilizando Azul de Trypan. A viabilidade celular foi de (1) 57%, (2) 77.8% e (3) 86.7%

Figura 23- A figura mostra a grande diferença nos índices de viabilidade celular na linhagem BexBra2. As células foram incubadas na presença e na ausência de Prima-1 a 50µM nas três diferentes concentrações de células (1) 1.0E+05, (2) 2.0E+05 e (3) 3.0+05 células/ml. Após 24 h as células foram removidas e o número final de células foi estimado utilizando Azul de Trypan. A viabilidade na concentração foi de (1) 17%, (2) 42.8% e (3) 28.6%

4.4 Avaliação da tumorigenicidade de linhagens de células de carcinoma urotelial da bexiga e de adenocarcinoma de próstata em camundongos atímicos

Várias tentativas foram feitas a fim de avaliarmos indução tumoral em camundongos atímicos a partir da inoculação de suspensão celular proveniente de nossas linhagens. Entretanto, não foi observado nenhum crescimento tumoral tanto no subcutâneo, quanto na região intraperitoneal em um período de observação médio de 8 semanas. Para descartarmos a possibilidade de erro técnico procedemos da mesma maneira com a linhagem comercial LNCaP, sabidamente tumorigênica em camundongos atímicos. Seis semanas após a inoculação da suspensão celular observamos crescimento tumoral em um camundongo, o qual foi sacrificado e submetido a estudo anátomo-patológico (Figuras 24 e 25).

Figura 24- Crescimento tumoral *in vivo* no subcutâneo da região dorsal de camundongo atímico da linhagem comercial LNCaP 6 semanas após a inoculação

Figura 25- Microfotografia representando crescimento tumoral *in vivo* de implante subcutâneo de células da linhagem comercial LNCaP. Coloração de hematoxilina & eosina em aumentos de 40X (**A** e **B**) e 400X (**C** e **D**)

Discussão

5. Discussão

Estabelecemos um total de seis linhagens tumorais, sendo três de CaP e três de CaB.

Linhagens tumorais constituem uma das principais ferramentas para o estudo do câncer. Contribuem para o estudo de novas modalidades terapêuticas (Yamori, 2003), identificação de propriedades funcionais das células cancerígenas como proliferação, capacidade migratória e indução da angiogênese (Kim; Stein, 2004), além de auxiliarem na identificação do perfil de expressão de diversos genes (Ross; Perou, 2001). Possibilitam ainda o desenvolvimento tumoral em modelos animais (Irizarry et al., 2003) constituindo uma ferramenta indispensável na compreensão dos eventos biológicos de diversos tumores.

Dentre as linhagens comerciais de CaP as mais utilizadas em pesquisas são DU-145, PC-3 e LNCaP provenientes de carcinoma metastático em sistema nervoso central, adenocarcinoma primário e metástase linfonodal, respectivamente (Stone et al., 1978; Kaighn et al., 1979). Chama a atenção que as linhagens mais comuns provêm de neoplasia metastática por estas apresentarem maior agressividade tumoral propiciando seu crescimento *in vitro*, o que limita a descoberta de alterações genéticas e funcionais de tumores localizados. Ainda, o CaP tem um comportamento bastante heterogêneo evidenciando a importância do estabelecimento e caracterização de novas linhagens para compreensão da história natural desta neoplasia (Lin et al., 1984). Linhagens celulares de CaP têm sido consideradas uma das mais difíceis de serem estabelecidas no que se referem ao estabelecimento de linhagens contínuas (Senthamil et al., 2005).

Em relação às linhagens tumorais de CaB, foram descritas 30 linhagens por Lin e cols. em 1984 (Hepburn et al., 1983; Webber et al., 1997). Atualmente estão disponíveis no ATCC 13 linhagens de CaB.

Apesar dessas peculiaridades demonstramos a exeqüibilidade do desenvolvimento de culturas de células de CaP e de CaB, com manutenção das características originais como, por exemplo, a expressão de citoqueratinas e PSMA

até a nona passagem para a linhagem de CaP PcBra1, e de linhagens obtidas de tumores menos agressivos como PcBra2, derivada de um tumor Gleason 6, a qual poderá nos auxiliar na investigação do comportamento de tumores com diferentes características histológicas e comportamento biológico.

Associado à dificuldade de importação e transporte dessas linhagens existem ainda, diferenças étnicas entre as populações o que torna interessante o estabelecimento destas novas linhagens celulares oriundas de espécimes tumorais de pacientes brasileiros para compreensão dos eventos biológicos característicos.

A contaminação de culturas celulares primárias por fibroblastos é um dos maiores problemas no estabelecimento de linhagens tumorais. Para a linhagem tumoral de próstata, tem-se relatado que a adição de espermina ao meio de cultura contendo soro fetal bovino resulta em oxidação dessa substância a um aminoaldeído instável que se decompõe liberando acroleína estável. Esta oxidação é catalisada pela amino oxidase presente no soro de ruminantes. As células epiteliais prostáticas são resistentes a este produto de oxidação, ao contrário dos fibroblastos da próstata os quais têm se mostrado seletivamente sensíveis (Webber et al., 1997). Notamos uma toxicidade da espermina as células epiteliais da próstata, que sofreram apoptose, e não resistiram aos tratamentos. Assim, abandonamos esta estratégia. Prosseguimos com a submissão das culturas celulares à inanição nutricional que demonstrou ser de fácil execução, barata e eficiente (Nayak; Dillman, 1991). Esta técnica foi aplicada tanto às linhagens de CaB como nas de CaP com sucesso em ambas. Outras metodologias têm sido descritas como o uso de anticorpos anti componentes específicos de fibroblastos como o Thy-1, uma glicoproteína de superfície, que não está presente em células epiteliais, raspagem (*scraping*) ou tripsinização diferencial e uso de meios suplementares inibidores de proliferação fibroblástica (toxina colérica, cis-hydroxyprolina) (Davis, 2004).

Micoplasmas são os menores microrganismos conhecidos com vida livre e auto-replicação, cujo tamanho permite sua passagem por filtros antibacterianos (Eisinge; Marco, 1982). A ausência de parede celular contribuiu para a sua inclusão na classe *Mollicutes*, sendo também responsável pelo seu acentuado polimorfismo e resistência aos antibióticos β -lactâmicos (Waites et al., 2001). São encontrados em

plantas, insetos, animais e seres humanos. A maioria pertence à flora normal de seus hospedeiros; entretanto, alguns são patogênicos possuindo um caráter oportunista (Razin et al., 1998).

A contaminação de culturas celulares por micoplasmas foi descrita pela primeira vez por Robinson e col. (Robinson et al., 1956) em fibroblastos humanos. Esta contaminação pode ocasionar diversas alterações citogenéticas (Sandhu et al., 2000), interrupção do metabolismo celular (Pollack et al., 1997), modulação da resposta imune (Chambaud et al., 1999) alterações morfológicas e cromossômicas (Razin et al., 1998) interferindo na caracterização das linhagens e comprometendo os dados das pesquisas. Aproximadamente, 30% das culturas celulares são infectadas por micoplasmas (Smith; Mowles, 1996). Na maioria dos casos, a contaminação ocorre através de reagentes utilizados nos processos de cultivo sendo sua disseminação facilitada por meio de aerossóis (Barile; Rottem, 1993). A disseminação pode ocorrer rapidamente no laboratório e por isso o rastreamento do micoplasma é uma necessidade e deve acontecer periodicamente.

Demonstramos através da técnica de PCR a ausência de contaminação de nossas culturas por micoplasma.

O tempo de duplicação de nossas linhagens de CaP foi de 50, 49 e 67 horas respectivamente para PcBra1, PcBra2 e PcBra3; tempo de geração considerado adequado próximo àqueles descritos em linhagens comerciais. As linhagens LNCaP e CRL-2505 apresentam tempo de duplicação de 34 e 40 horas respectivamente (www.atcc.org).

O tempo de duplicação das linhagens de CaB foi de 58, 96 e 43 horas para BexBra1, BexBra2 e BexBra4 respectivamente. BexBra1 apresentou nos primeiros experimentos um tempo de duplicação longo de 84,8 h, considerado muito alto para neoplasia de alto grau, que agora foi reduzido em mais de 60%.

Apesar do comportamento por vezes bastante agressivo dos tumores de bexiga, o tempo de duplicação das linhagens derivadas dos tumores da próstata foi relativamente menor. É importante ressaltar que as características dos tumores submetidos ao cultivo podem diferir daquelas observadas no comportamento biológico da doença devido às diferenças do microambiente (Ian Freshney, 2005).

Embora não conste o tempo de duplicação de todas as linhagens de CaP e de CaB disponíveis no ATCC podemos verificar diferenças, não condizentes com o comportamento clínico destes tumores, entre a linhagem de CaB *SW 780 CRL-2169* cujo tempo de duplicação é de 38h quando comparado com o da linhagem de CaP *WPE-stem* que apresenta 24h.

A caracterização das curvas de crescimento das culturas celulares é importante para avaliação de agentes com ação quimioterápica, redução do crescimento celular, assim como indução de apoptose e/ou necrose.

A expressão de citoqueratinas, pan-citoqueratina para as linhagens de próstata confirmaram o fenótipo epitelial. O estudo imunocitoquímico com a utilização do anticorpo anti-PSMA nas linhagens de CaP confirmou sua origem prostática. A expressão dos produtos de secreção da próstata é em geral negativa nas linhagens celulares. Nós demonstramos, porém uma fraca expressão de PSMA em todas as linhagens de CaP estudadas. A sensibilidade e especificidade do PSMA no reconhecimento de tumores de próstata são de 65,9% e 94,5% respectivamente segundo estudo publicado por Mhawech-Fauceglia e cols. (2007). A pesquisa de PSA (Prostate Specific Antigen) foi negativa, assim como o receptor androgênico. PSA é um marcador bastante sensível e específico das células epiteliais prostáticas, porém a perda da sua expressão tem sido relatada em casos de câncer avançado e naqueles expostos a regimes de bloqueio androgênico. Recentemente foi descrito em estudo de *tissue microarray* com adenocarcinomas pouco diferenciados da próstata uma positividade de 97,4% para PSA e 92,1% para PSMA (Mhawech-Fauceglia et al., 2007). Em estudo nosso, encontramos expressão consistente de PSA (87,7%) mesmo em adenocarcinomas pouco diferenciados e em histologias especiais que poderiam influenciar no diagnóstico diferencial de neoplasias de outras origens (Leite et al., 2008). Alguns autores, porém mostram uma diminuição acentuada da expressão do PSA principalmente em tumores pouco diferenciados, com 23% de positividade em tumores com Gleason 10 (5+5) (Goldstein, 2002). Esta perda de expressão de PSA que demonstramos nas nossas linhagens de CaP pode estar relacionada à seleção de células mais indiferenciadas durante o processo de cultivo, comprometidas mais com o processo de crescimento do que o de secreção.

De qualquer modo a expressão de citoqueratinas garante o fenótipo epitelial, assim como a negatividade de citoqueratina 7 elimina a possibilidade de contaminação com a linhagem de câncer urotelial, que como já demonstramos expressou fortemente esta proteína do citoesqueleto.

Avaliamos também no carcinoma de próstata a expressão do receptor androgênico, que foi negativa. Da mesma forma, a seleção de células andrógeno-independentes pode ter ocorrido no processo de cultivo, cujo meio não contém complemento hormonal, essencial para a sobrevivência e crescimento destas células. Embora a ausência de expressão do receptor androgênico possa limitar a utilidade destas linhagens como modelo para estudos de novos agentes terapêuticos que atuam via bloqueio androgênico, as mesmas poderão ser úteis em estudos relacionados às diferenças no perfil de expressão de genes relacionados com a progressão do CaP com crescimento andrógeno independente (Hokaiwado et al., 2008).

As linhagens de CaB apresentaram características típicas do urotélio como expressão forte de citoqueratina 7 e negatividade para vimentina

A negatividade para vimentina, desmina e fator VIII afastou a possibilidade de contaminação por fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais nas linhagens de CaP e de CaB.

Procedemos ainda à análise de alterações moleculares que são comuns em neoplasias epiteliais humanas.

A primeira alteração estudada foi a imunexpressão de P53. A perda da função de P53 é a alteração mais importante do carcinoma urotelial de alto grau invasivo. Tem relação com desenvolvimento e progressão da neoplasia. Sua mutação tem sido relacionada à resistência ao tratamento quimioterápico e menor sobrevivência global e livre de doença (Mitra et al., 2006).

A proteína P53 em condições fisiológicas é expressa a baixos níveis nas células, apresentando uma meia vida curta, de aproximadamente 20 min (Bykov et al., 2002), sendo que mutações geralmente promovem a sua estabilização, permitindo a sua detecção por imunocitoquímica, embora esta correlação não seja sempre verdadeira (Bykov et al., 2002). Apesar da correlação entre imunexpressão

de P53 e mutação, existem alterações que não promovem a estabilização da proteína, assim como outras anormalidades em proteínas reguladoras de P53, como, por exemplo, a superexpressão de MDM2 a qual pode promover a degradação da proteína, tornando o teste imunocitoquímico negativo.

Análises de expressão através da imunocitoquímica mostraram imunoexpressão positiva em BexBra1 e em BexBra4 não havendo correlação entre a imunoexpressão, e a ausência de mutação confirmada através de seqüenciamento. BexBra2 apresentou correlação entre a imunoexpressão negativa e a ausência de mutação nos exons analisados.

Alguns autores têm sugerido uma associação entre um pior prognóstico diante da imunoexpressão positiva de P53 detectada por imunocitoquímica mesmo na ausência de mutações detectadas em *p53*. Alterações em outros genes diferentes daqueles envolvidos na via de *p53* poderiam produzir o acúmulo da proteína propiciando um fenótipo positivo não relacionado com a presença de mutação em *p53* (Abdel-Fattah et al., 1998).

Além disso, a expressão da proteína P53 na presença de *p53* selvagem poderia ser causada em parte por alterações na via p14/ Mdm2 (Mitra et al., 2006) o que poderia justificar as discordâncias entre os resultados obtidos na imunocitoquímica e os achados encontrados no seqüenciamento.

Em relação à análise cariotípica, nossos achados revelaram aneuploidias em todas as células analisadas corroborando com outros trabalhos que relatam a presença de inúmeras anormalidades cromossômicas no estabelecimento de linhagens tumorais. Brothman e cols (1991), Shahriar e cols (2004) demonstraram a presença de anormalidades cromossômicas em linhagens derivadas de tumores de próstata como o ganho dos cromossomos 3,4,6-8,14,18-20, além de rearranjos e deleções. As análises cariotípicas das linhagens de CaB Cal 29 e Cal 185, revelaram a presença de hiperploidia (Cattan et al., 2001).

As análises das alterações do gene EGFR na linhagem PcBra1 pela técnica de FISH demonstraram um aumento do número de cópias do gene, associado a um aumento do número de cromossomos (poliploidia). Este achado é comum em câncer de pulmão e tem relação com o prognóstico da neoplasia. A linhagem PcBra3

demonstrou amplificação do gene e a linhagem PcBra2 não demonstrou alterações no número de cópias do gene.

EGFR tem sido associado com a progressão do CaP. Skacel e cols. (2001), demonstraram elevação do nível de RNAm do gene EGFR no adenocarcinoma da próstata quando comparado com amostras de tecido normal e de hiperplasia benigna prostática. Entretanto, a amplificação no gene EGFR configurou-se como rara neste estudo, especulando-se que outros mecanismos poderiam mediar sua super-expressão (Cui et al., 1998; Bartlett et al., 2005). Cho e cols. (2008), ao avaliarem 20 amostras de CaP hormônio refratário, demonstraram amplificação para EGFR em 30% das amostras de adenocarcinoma acinar e ausência de amplificação nas amostras do tipo adenocarcinoma ductal. Ainda, Thangapazham e cols. (2008) recentemente demonstraram um papel inibitório do curcumin sobre EGFR.

Alterações nos cromossomos 7,17 e 3 do gene p21 nas linhagens de CaB BexBra1 e BexBra4 não foram identificadas. Curiosamente, o teste realizado no espécime cirúrgico, incluído em parafina do tumor que originou a linhagem BexBra1, numerosas aberrações foram identificadas. Especulamos que as aberrações cromossômicas intensas são incompatíveis com um crescimento contínuo *in vitro* e uma seleção de células com maior estabilidade cromossômica seja responsável por esta discrepância entre os achados do tumor primário e a linhagem estabelecida.

O exame da linhagem BexBra2 demonstrou em células isoladas, de núcleos de maior tamanho, aumento do número de cópias do cromossomo 17. Não identificamos perda do locus 9p21 ou anormalidades nos cromossomos 3 e 7.

A progressão do carcinoma urotelial tem sido associada com eventos de instabilidade genética nos cromossomos 3, 7, 9 e 17 que estão freqüentemente envolvidos na carcinogênese urotelial (Knowles, 1989; Cianciulli et al., 2003).

Gallucci e cols. (2005), ao avaliarem o gene p21 em amostras de tecido de CaB não encontraram nenhuma diferença significativa nos achados de deleções do locus 9p21 entre as células malignas e não malignas. A análise dos cromossomos 3, 7 e 17 revelaram inúmeras aberrações nas amostras analisadas. Diferenças significantes foram observadas entre células malignas e não malignas quando da análise dos cromossomos 7 e 17 (Gallucci et al., 2005). Estes resultados

corroboram com aqueles demonstrados por Cordon-Cardo e cols. (1997) os quais evidenciaram a presença de monossomia nos cromossomos 3, 7 e 17 em estágios T3-4.

A caracterização genômica das culturas através da avaliação de *short tandem repeats* (STR) tem sido considerada obrigatória quando do estabelecimento de linhagens celulares. Isso se deve a ocorrência comum de contaminação cruzada entre diferentes linhagens. Nossas análises revelaram ausência de contaminação cruzada entre as linhagens estabelecidas. A contaminação cruzada entre linhagens celulares é um problema há tempos relatado, presente em estudos que envolvem a manipulação de várias linhagens celulares (Markovic O, Markovic N, 1998; Masters et al., 2001). Nelson-Rees e cols. (1981) evidenciou a presença de contaminação cruzada em inúmeras culturas pela linhagem HeLa. Desde então, inúmeros casos de contaminação têm sido descritos. Este evento compromete a reprodutibilidade dos dados experimentais, acarreta prejuízos financeiros por ocasionar problemas no licenciamento de novos medicamentos e de novas patentes (Edmund et al., 2009). O conceito de identidade do DNA, *fingerprinting*, foi introduzido após a descoberta das regiões hipervariáveis desta molécula. Seu uso para a autenticação de linhagens celulares foi descrito primeiramente em 1988 por Masters e cols. (Masters et al., 1988) e por Thacker e cols (1988). O *fingerprinting* do DNA, pela técnica de STR, é atualmente o método de escolha para a autenticação de linhagens celulares (Parson et al., 2005). O controle sobre a contaminação cruzada entre linhagens celulares não é uma prática freqüente nos laboratórios apesar da importância óbvia deste problema (Markovic O, Markovic N, 1998).

Os resultados demonstrados após exposição das linhagens PcBra1, BexBra1 e LNCaP ao tratamento com concentrações crescentes de curcumin, analisados pela técnica de citometria de fluxo, revelaram um índice maior de apoptose na concentração de 50 μ M nas três linhagens.

O dano celular foi medido por análises da fluorescência emitida pelo iodeto de propídeo (PI) e pela anexina V. O PI é um marcador que é excluído de células saudáveis, sendo capaz de penetrar em membranas não íntegras e ligar em ácidos nucleicos, tornando-se assim fluorescente e podendo ser observado (Macklis,

Madison, 1990). A anexina V se liga a fosfatidilserina presente na superfície das células apoptóticas (Koopman et al., 1994).

As análises referentes à viabilidade celular após exposição ao curcumin a 50 μ M demonstraram acentuada redução da viabilidade nas três concentrações de células testadas nas linhagens PcBra1, PcBra2 e PcBra3. Em relação às linhagens de CaB, a redução da viabilidade celular se mostrou significativa, entretanto, de uma maneira menos acentuada do que na observada nas linhagens de CaP.

A ação do curcumin como agente preventivo do câncer tem sido demonstrada no câncer de cólon, pele, estômago, fígado, pulmão e mama (Duvoix et al., 2005; Sharma et al., 2005; Singh; Khar, 2006). Recentemente, Hong e cols. (2006) descreveram a ação do curcumin sobre a linhagem DU-145 de CaP. Demonstraram a diminuição do potencial de invasividade da neoplasia após exposição ao curcumin. Com a medida de expressão mostraram que esta ação se deve, pelo menos parcialmente, a inibição das metaloproteinases 2 e 9, enzimas proteolíticas que degradam vários componentes da matriz extracelular.

Alguns tumores de CaP, são resistentes a indução da apoptose quando expostos a determinados agentes quimioterápicos como a radiação. Chendil e cols. (2004) demonstraram que o curcumin aliado à radiação sensibiliza as células tumorais a apoptose. A linhagem de CaP PC-3, quando submetida a uma concentração de 2-4 μ M de curcumin combinado à radiação, apresentou significativo aumento da apoptose e inibição da proliferação celular (Chendil et al., 2004). O efeito do curcumin na sensibilização das células expostas à radiação ocorre através da regulação negativa da expressão de genes relacionados à sobrevivência das células tumorais (Chendil et al., 2004).

Na linhagem de CaB T24, Park e cols. (2006) inibiram o crescimento das células tumorais induzindo a parada na fase G2/M do ciclo celular, efeito este associado à regulação negativa da ciclina A e regulação positiva do p21, inibidor de Cdk. Vários estudos têm demonstrado o efeito citotóxico do curcumin em relação ao desenvolvimento de linhagens celulares cultivadas *in vitro*. Hanif e cols. (1997) demonstraram a inibição da proliferação, a indução da apoptose e a estagnação de linhagens celulares na fase G2/M do ciclo celular, quando expostas a este composto.

O mecanismo de indução da apoptose pelo curcumin é bastante variável, incluindo efeitos sobre a estabilidade do *p53*, liberação do citocromo c pela membrana mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (Aggarwal et al., 2003). A inibição das vias de sinalização celular como Akt, NF- κ B, AP-1 ou JNK também se configura como uma forma para promoção da apoptose mediante ação deste composto assim como a regulação positiva e negativa de genes relacionados a danos no DNA e à sobrevivência celular como *egr-1*, *c-myc*, *bclX (L)* (Scott, Loo, 2004), respectivamente.

Com base em nossos resultados e com os dados da literatura, podemos evidenciar a potencialidade do curcumin como um alternativo e importante agente terapêutico inibindo significativamente o desenvolvimento do CaP e do CaB.

Submetemos também as linhagens BexBra1, BexBra2 e BexBra4 a tratamento com Prima-1. No experimento utilizando a linhagem BexBra1, houve uma pequena redução da viabilidade celular (6 - 28% de células viáveis). Em BexBra4 observamos uma redução mais significativa da viabilidade (43% de células viáveis) somente na primeira concentração de células testadas. Entretanto, BexBra2 foi a mais afetada pelo tratamento utilizando Prima-1 com redução da viabilidade celular entre 57 - 83% nas três concentrações testadas. As análises após tratamento com Prima-1 foram feitas apenas nas linhagens de CaB já que a perda da função de P53 é a alteração mais importante do carcinoma urotelial de alto grau invasivo.

BexBra2 e BexBra4 que não apresentaram mutações nos exons 5, 7 e 8 do gene *p53* analisados por seqüenciamento, tiveram surpreendente redução na viabilidade celular após exposição ao Prima-1, 17 - 43% e 57% de células viáveis respectivamente. Por outro lado não foi observada morte celular significativa em BexBra1 a qual também não apresentou nenhuma mutação nos exons avaliados. Estes resultados contrastam com a maioria dos achados da literatura que indicam restauro da função de *p53* mutado mediante ação de Prima-1 com conseqüente indução de apoptose (Wang, 2007). Na maioria das vezes, tumores que apresentam *p53* mutado mostram-se mais resistentes ao tratamento quimioterápico quando comparados àqueles que apresentam o tipo selvagem (Bykov et al., 2002).

Entretanto, alguns autores apontam resultados semelhantes aos nossos. Sui e cols. (2009) demonstraram a indução de apoptose em células de câncer pancreático (Capan-2) as quais exibem *p53* selvagem, após exposição à Prima-1. Resultado semelhante foi observado por Supiot e cols.(2008) em células de CaP assim como em células de leucemia linfocítica crônica (Nahi et al., 2004), leucemia mielóide aguda (Nahi et al., 2006) e em linhagens de câncer de pulmão apresentando *p53* selvagem (Chipuk et al., 2003).

Os mecanismos responsáveis por esta ação preferencial de Prima-1 sobre as células *p53* mutadas bem como as vias envolvidas na morte celular são desconhecidos. Aparentemente Prima-1 restaura o sítio de ligação mutado de *p53*, permitindo a ativação da transcrição de genes como, WAF1, Bclx e PUMA que atuam na inibição do ciclo celular e indução da apoptose (Wang , 2007; Shi et al., 2008).

Diversas vias podem interagir com *p53* tais como PTEN, MDM2, causando sua inativação, conforme ilustrado na figura abaixo.

Figura 26- Heterogeneidade das vias envolvidas na inativação de p53 em cânceres humanos: **1.** Mutações em p53 podem ser encontradas em 50% dos cânceres humanos, mas sua penetrância é bastante heterogênea, como demonstrado pela diversidade da atividade de transativação que varia entre 0 a 100%. **2.** SV40, HPV ou adenovírus, codificam proteínas que atuam junto à proteína p53. **3.** No câncer de mama inflamatório e no neuroblastoma, p53 é encontrado predominantemente no citoplasma. **4.** O acúmulo de mdm2 pode ser encontrado em diversos tipos de tumores. **5.** PTEN, gene regulador de p53, encontra-se mutado em vários tipos de cânceres. **6.** Embora não haja descrição de mutação em AKT, a ativação constitutiva de sua atividade quinase tem sido relatada desregulando as vias acima de p53. **7.** Mutações nas vias acima de p53 (ATM, p19ARF ou gene Hcdk2) podem ser observadas em diversos tipos de tumores (<http://p53.free.fr>)

Dentre as diversas vias, MDM2 destaca-se como uma das principais. Além de interagir com p53 promovendo sua ubiquitinação e conseqüente degradação, a mesma também pode reprimir a atividade transcricional de p53 quando ativada (<http://p53.free.fr>). Onel e cols. (2004) demonstraram a amplificação de MDM2 em sarcomas com conseqüente perda do controle do crescimento celular mediado por p53. MDM2 é inibido transcricionalmente por p14 (Zhang et al., 1998) podendo ser inativado por deleção ou ocorrência de metilação em sua região promotora (Dulaimi et al., 2004; Chang et al., 2006; Kawamoto et al., 2006; Yates et al., 2006;).

A via MDM2 é apenas uma das diversas vias que interage com *p53* assim como PTEN que se encontra mutado em vários tipos de cânceres, além de inúmeras vias situadas a cima de *p53* (ATM, p19ARF) nas quais podem ser encontradas diversas mutações (<http://p53.free.fr>). Desta maneira, pode-se sugerir que vias alternativas poderiam ser alvo de Prima-1 independente do status de *p53* assim como foi observado em nossos resultados e nos trabalhos citados os quais demonstraram indução de apoptose após exposição à Prima-1 independente de mutação em *p53*.

É preciso ressaltar que não há trabalhos na literatura que elucidem a ação de Prima-1 em linhagens de CaB o que poderia ser um campo promissor para pesquisas relacionadas à compreensão das vias moleculares envolvidas no processo de apoptose mediado por Prima- 1 no carcinoma urotelial.

A última etapa do nosso estudo foi à avaliação da tumorigenicidade das linhagens de CaP e de CaB em camundongos atímicos. Várias tentativas foram feitas a partir da inoculação de suspensão celular no tecido subcutâneo e intraperitoneal. Entretanto, não foi observado nenhum crescimento tumoral por um período de observação médio de 8 semanas, exceto para um camundongo no qual procedemos ao implante subcutâneo de suspensão celular derivada da linhagem LNCaP.

Nossas linhagens mostraram-se não tumorigênicas em camundongos atímicos. Conforme ilustrado na Tabela 7, procedemos ao implante intraperitoneal apenas com a linhagem PcBra3 e além disso, não avaliamos a tumorigenicidade de BexBra2 e BexBra4 por estas virem a apresentar condições adequadas de crescimento tardiamente, levando ainda em consideração a grande quantidade de células necessárias para este experimento. A ausência de formação tumoral nos camundongos atímicos, após inoculação de suspensão celular obtida de nossas linhagens, poderia ser explicada por esta ter sido inoculada em um sítio heterotópico carente de fatores presentes no tecido prostático e no tecido urotelial e ainda, no caso das linhagens de CaP, por estas serem derivadas de tumores primários de baixo grau (Shahriar et al., 2004).

Estudo realizado por Shen e cols (2008), demonstrou que a linhagem HEK 293, obtida de um câncer de rim, apresentou uma maior tumorigenicidade com o aumento do número das passadas. Verificaram crescimento tumoral após duas semanas da inoculação de suspensões celulares referentes às 65^o e 71^o passadas, o que não foi observado com células das passagens 24^o e 52^o após um período de 8 semanas de observação.

A confirmação da não tumorigenicidade de nossas linhagens será feita através de novas tentativas utilizando-se protocolos obtidos de trabalhos que reportam a tumorigenicidade de linhagens de CaP e de CaB. Estrada e cols. (2006) desenvolveram um modelo ortotópico para cultura de células de CaB no qual a extensão e comportamento do tumor são avaliados através de imagens de fluorescência geradas por minúsculos pontos em nanocristais semicondutores, conhecidos como pontos quânticos (Qdot -*quantum dots*). Resumidamente, células de linhagem de carcinoma de células transicionais, foram marcadas com Qdot e instiladas dentro da bexiga de ratos a qual foi posteriormente removida e cultivada *ex vivo* configurando-se como uma alternativa para avaliarmos a tumorigenicidade de nossas linhagens.

É importante ressaltar que há várias linhagens que não são tumorigênicas como pode ser verificado na Tabela 1, referente às linhagens comerciais de CaP disponíveis no ATCC, e em vários trabalhos descritos na literatura. Shahriar e cols. (2004) estabeleceram a linhagem E06AA, derivada de um CaP primário, que não mostrou qualquer evidência de crescimento tumoral *in vivo*. Cattani e cols (2001) ao relatarem o estabelecimento de duas linhagens de CaB (CAL 29 e CAL 185), provenientes de tumores de células transicionais de alto grau e invasivos, demonstraram a presença de tumorigenicidade apenas em CAL 129 após um período de observação de seis meses .

Embora o não desenvolvimento tumoral possa limitar a utilidade destas linhagens como modelo *in vivo*, as mesmas poderão ser úteis como modelos *in vitro* auxiliando na investigação do comportamento biológico da doença em sua fase inicial.

Como perspectivas deste estudo, prosseguiremos com novas tentativas de implantes tumorais a partir de suspensões celulares obtidas de nossas linhagens em camundongos atímicos, seguindo protocolos diferentes daqueles já testados e avaliaremos o efeito de Prima-1 na expressão dos genes envolvidos na morte celular programada em linhagens de CaB.

Conclusões

6. Conclusões

Desenvolvemos três linhagens de CaP e três linhagens de CaB, caracterizadas por análise da cinética de crescimento, análises imunocitoquímicas e análises citogenéticas.

Demonstramos momentaneamente, que as linhagens não são tumorigênicas em camundongos atímicos.

Curcumin na concentração de 50 μ M induziu morte celular em todas as linhagens estudadas. Seu efeito foi mais evidente nas linhagens de CaP.

Prima-1 reduziu a viabilidade celular independente do status de *p53* nas linhagens de CaB.

Referências

8. Referências

Abdel-Fattah R, Challen C, Griffiths TR, Robinson MC, Neal DE, Lunec J.: Alterations of TP53 in microdissected transitional cell carcinoma of the human urinary bladder: high frequency of TP53 accumulation in the absence of detected mutations is associated with poor prognosis. *Br J Cancer* 12: 2230-8, 1998

Abe Y, Hashimoto S and Horie T.: Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res* 39: 41-7, 1999

Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC.: Anticancer potencial of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 23: 363-398, 2003

Aggarwal S, Takada Y, Singh S, Myers JN, Aggarwal BB.: Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. *Int J Cancer* 111: 679- 692, 2004

American Cancer Society. *Cancer facts & figures 2008*. Atlanta: American Cancer Society, 2008

Andriole, G. L. *et al.* Prostate cancer screening in the prostate, lung, colorectal and ovarian (PLCO) cancer screening trial: findings from the initial screening round of a randomized trial. *J. Natl Cancer Inst* 97: 433–438, 2005

Asker, C., Wiman, K.G. and Selivanova, G. : p53-induced apoptosis as a safeguard against cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265: 1–6, 1999

Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R *et al* EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 54:303–314, 2008

Barile MF, Rottem S.: Mycoplasmas in cell cultures. In: Kahane I, Adoni A.: *Rapid diagnosis of mycoplasmas*. Plenum 155-193, 1993

Barry MJ, Albertsen PC, Bagshaw MA, Blute ML, Cox R, Middleton RG, Gleason DF, Zincke H, Bergstralh EJ, Jacobsen SJ: Outcomes for men with clinically nonmetastatic prostate carcinoma managed with radical prostatectomy, external beam radiotherapy, or expectant management: a retrospective analysis. *Cancer* 91:2302-14, 2001

Bartlett JM, Brawley D, Grigor K, Munro AF, Dunne B, Edwards J.: Type I receptor tyrosine kinases are associated with hormone escape in prostate cancer. *J Pathol* 205: 522–529, 2005

Beroud C, Soussi T.: p53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res* 26: 200–4, 1998

Bharat B. Aggarwal, Anushree Kumar and Alok C. Bharti. Anticancer Potential of Curcumin: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer Research* 23: 363-398, 2003

Boyle P, Severi G, Giles GG.: The epidemiology of prostate cancer. *Urol Clin North Am* 30: 209 – 17, 2003

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de câncer 2008: [Acesso 26 maio 2009]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>

Brothman AR, Peehl DM, Patel AM, MacDonald GR, McNeal JE, Ladaga LE, Schellhammer PF. Cytogenetic evaluation of 20 cultured primary prostate tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 55: 79-84, 1991

Bykov, V.J.N., Issaeva,N., Shilov, A., et al.: Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nature Med* 8: 282-288, 2002

Bykov VJN, Selivanova G, Wiman KG.: Small molecules that reactivate mutant p53. *Eur J Cancer* 39:1828–34, 2003

Carter H.B., Pearson J.D.: Prostate-specific antigen testing for early diagnosis cancer: formulation of guidelines. *Urology* 54:780-786, 1999

Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL, et al.: Evaluation of percentage of free serum prostatespecific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. *JAMA*. 274:1214-1220, 1995

Cattan N, N Rochet, C Mazeau et al. Establishment of two new human bladder carcinoma cell lines, CAL 29 and CAL 185. Comparative study of cell scattering and epithelial to mesenchyme transition induced by growth factors. *BJC* 85:1412-1417, 2001

Chambaud I, Wroblewski H, Blanchard A. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. *Trends Microbiol* 7: 493-499, 1999

Chang LL, Yeh WT, Yang SY, et al: Genetic alterations of p16INK4a and p14ARF genes in human bladder cancer. *J Urol* 170:595-600, 2003

Chendil, D., Ranga, R. S.; Meigooni, D.; Satishkumar, S.; Ahmed, M.A.: Curcumin confers radiosensitizing effect in prostate cancer cell line PC-3. *Oncogene* 23:1599-1607, 2004

Chipuk JE, Maurer U, Green DR, Schuler M.: Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell* 4: 371–381, 2003

Cho KS, Lee JS, Cho NH, Park K, Ham WS, Choi YD.: Gene amplification and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 68: 803-8, 2008

Cianciulli AM, Leonardo C, Guadagni F, et al.: Genetic instability in superficial bladder cancer and adjacent mucosa: an interphase cytogenetic study. *Hum Pathol* 34:214–21, 2003

Cipriani B, Borsellino G, Knowles H, Tramonti D, Cavaliere F, Bernardi G, Battistini L and Brosnan CF.: Curcumin inhibits activation of Vgamma9Vdelta2 T cells by phosphoantigens and induces apoptosis involving apoptosis-inducing factor and large scale DNA fragmentation. *J Immunol* 167: 3454-62, 2001

Cook LS, Goldoft M, Schwartz SM, et al. Incidence of adenocarcinoma of the prostate in Asian immigrants to the United States and their descendants. *J Urol*. 161:152-155, 1999

Cordon-Cardo C, Sheinfeld J, Dalbagni G.: Genetic studies and molecular markers of bladder cancer. *Semin Surg Oncol* 13:319–27, 1997

Cory AH, Chen J, Cory JG.: Effects of PRIMA-1 on wild-type L1210 cells expressing mutant p53 and drug-resistant L1210 cells lacking expression of p53: necrosis vs. apoptosis. *Anticancer Res*. 26:1289-95, 2006

Cui J, Deubler DA, Rohr LR, Zhu XL, Maxwell TM, Changus JE, Brothman AR.: Chromosome 7 abnormalities in prostate cancer detected by dual-color fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 107:51–60, 1998

Davis JM. Basic cell culture. A practical approach. , 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2004

Dearnaley DP. Cancer of the prostate. *BMJ* 308:780–4, 1994

Dorai T, Cao YC, Dorai B, Buttyan R, Katz AE. Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer.: III. Curcumin inhibits proliferation, induces apoptosis, and inhibits angiogenesis of LNCaP prostate cancer cells in vivo. *Prostate* 47:293-303, 2001

Dulaimi E, Uzzo RG, Greenberg RE, et al.: Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin Cancer Res* 10:1887-1893, 2004

Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F et al.: Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Letters* 223:181-190, 2005

Edmund Chiong, Ali Dadbin, Loleta D. Harris, Anita L. Sabichi and H. Barton Grossman. The Use of Short Tandem Repeat Profiling to Characterize Human Bladder Cancer Cell Lines. *The Journal of Urology* 181: 2737-2748, 2009

Eisinger M and Marco O. Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin: Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 79:2018-2022, 1982

El-Deiry WS. The p53 pathway and cancer therapy. *Cancer J* 11:229–36, 1998

Epstein J.I., Allsbrook W.C. Jr. Amin M.B. et al.: The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 29:1228-42, 2005

Epstein J.I., Amin MB, Reuter VE, Mostofi FK.: The World Health Organization/International Society of Urological Pathology Consensus Classification of Urothelial (Transitional Cell) Neoplasms of the Urinary Bladder. *Am J Surg Pathol*. 22:1435–1448, 1998

Estrada Carlos R, Matthew Salanga, Diane R. Bielenberg et al. Behavioral Profiling of Human Transitional Cell Carcinoma Ex vivo. *Cancer Res* 66: 3078-86, 2006

Gao X, Kuo J, Jiang H, et al.: Immunomodulatory activity of curcumin: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity and cytokine production *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 68:51-61, 2004

Giovannucci E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: A review (United States). *Cancer Causes Control* 16:83-95, 2005

Giovannucci E, Liu Y, Stampfer MJ, Willett WC. A prospective study of calcium intake and incident and fatal prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2:203-10, 2006

Giovannucci EL, Liu Y, Platz EA, Stampfer MJ, Willett WC. Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *Int J Cancer* 121:1571 – 8, 2007

G.J. Kelloff, CW. Boone, V. E. Steele, J.R. fay, R.A. Lubet, J. A. Crowell, C.C. Sigman: Mechanistic considerations in chemopreventive drug development, *J. Cell Biochem.* 20: 1-24, 1994

Gleason D.F: Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Hum Pathol* 23: 273-279, 1992

Goldstein NS: Immunophenotypic characterization of 225 prostate adenocarcinomas with intermediate or high Gleason scores. *Am J Clin Pathol* 117:471-477, 2002

Gomella LG. Contemporary use of hormonal therapy in prostate cancer: managing complications and addressing quality-of-life issues. *BJU Int.* 99:25-29, 2007

Gomez-Lechon MJ, O'Connor E, Castell JV and Jover R: Sensitive markers used to identify compounds that trigger apoptosis in cultured hepatocytes. *Toxicol Sci* 65: 299-308, 2002

Gontero P, Tizzani A, Muir GH, caldera E, Pavone Macaluso M.: The genetic alterations in the oncogenic pathway of transitional cell carcinoma of the bladder and its prognostic value. *Urol Res* 29:377-87, 2001

Gu F. Epidemiological survey of benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer in China. *Chin Med J (Engl)*. 113:299-302, 2000

Hahm, E. R.;Gho, Y.S.; Park, S.; Park, C.; Kim, K. W.; Yang, C.H.: Synthetic curcumin analogs inhibit activator protein-1 transcription and tumor-induced angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 321:337-344, 2004

Halling KC. Vysis UroVysion for the detection of urothelial carcinoma. *Expert Ver Mol Diagn* 3:507-19, 2003

Hanif R, Qiao L, Shiff SJ, et al.: Curcumin, a natural plant phenolic food additive inhibits cell proliferation and induces cell cycle changes in colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway. *J Lab Clin Med* 130:576-584, 1997

Hepburn, P. J., and Masters, J. R. W. The biological characteristics of continuous cell lines derived from human bladder. *Pathology of Bladder Cancer*. 2 th ed. Cleveland, OH. p.213-227, 1983

H. Nahi, S. Lehmann and L. Mollgard *et al.*: Effects of PRIMA-1 on chronic lymphocytic leukaemia cells with and without hemizygous p53 deletion, *Br J Haematol* 127:85–291, 2004

Hokaiwado N, Takeshita F, Naiki-Ito A, Asamoto M, Ochiya T, Shirai T. Glutathione S-transferase Pi mediates proliferation of androgen-independent prostate cancer cells. *Carcinogenesis*. 29:1134-8, 2008

Homero Oliveira de Arruda; J P B Vieira Filho; V Ortiz; M Srougi. PSA e medidas antropométricas em índios da Amazônia: avaliação da comunidade Parkatejê. *Rev Saúde Pública* 3:624-8, 2003

Hong JH, Ahn KS, Bae E, Jeon SS, Choi HY.: The effects of curcumin on the invasiveness of prostate cancer in vitro and in vivo. *Prost Ca and Prost Dis*. 9:147-152, 2006

Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP.: LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43:1809–1818, 1983

Huang HC, Jan TR and Yeh SF. Inhibitory effect of curcumin, an anti-inflammatory agent, on vascular smooth muscle cell proliferation. *Eur J Pharmacol* 221: 381-4, 1992

Huang, T.S.; Lee, S.C.; Lin, J.K. Suppression of c-Jun/AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5292-5296, 1991

Ian Freshney R. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5nd ed. John Wiley & Sons, 2005

INCA. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 16 mço. 2009.
Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP: Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4:249-64, 2003

Janssen BJA, Smits JFM. Autonomic control of blood pressure in mice: basic physiology and effects of genetic modification. *Am J Regul Integr Comp Physiol* 282: 1545-64, 2002

Jiang MC, Yang-Yen HF, Yen JJ and Lin JK: Curcumin induces apoptosis in immortalized NIH 3T3 and malignant cancer cell lines. *Nutr Cancer* 26: 111-20, 1996

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics 2008. *CA Cancer J Clin.* 58:71-96, 2008

Jonathan L. Wright, MD, MS, Paul H. Lange MD, FACS. Newer Potential Biomarkers in Prostate Cancer. *Rev Urol.* 9: 207–213, 2007

J. Hatina, W. Huckenbeck, H. Rieder, H.-H. Seifert, W.A. Schulz. Bladder carcinoma cell lines as models of the pathobiology of bladder cancer. Review of the literature and establishment of a new progression series. *Urologe A.* 47:724-34, 2008

Kaighn ME, Shankar N, Ohnuki Y, Lecher F, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17:16–23, 1979

Kawamoto K, Enokida H, Gotanda T, et al: p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 339:790-796, 2006

Kim JB, Stein R, O'Hare MJ: Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer – a review. *Breast Cancer Res Treat* 85:281-9, 2004

Knowles MA. The genetics of transition cell carcinoma: progress and potential clinical application. *BJU Int* 84:412-27, 1989

Koopman G., et al. Annexin V for Flow Cytometric Deyection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. *Blood* 84:1415-1420, 1994

Kumar RJ, Barqawi A, Crawford ED. Adverse events associated with hormonal therapy for prostate cancer. *Rev Urol.* 7:37-43, 2005

Leite, KRM; Mitteldorf, C. A. T. S.; Srougi, M.; Dalloglio, M. F.; Antunes, A. A.; Pontes JR., J.; Camaralopes, L. H. : Cdx2, cytokeratin 20, thyroid transcription factor 1, and prostate-specific antigen expression in unusual subtypes of prostate cancer. *Annals of Diagnostic Pathology* 12:260-266, 2008

Leonard G. Gomella, James Johannes, and Edouard J. Trabulsi. Current Prostate Cancer Treatments: Effect on Quality of Life. *Urology* 73:28–35, 2009

Lin, C-W., Lin. J. C., and Prout, G. R., Jr. Establishment and characterization of four human bladder tumor cell lines with different degrees of malignancy. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 25: 31, 1984

Literat A, Su F, Norwicki M, Durand M, Ramanathan R, Jones CA, Minoo P and Kwong KY: Regulation of pro-inflammatory cytokine expression by curcumin in hyaline membrane disease (HMD). *Life Sci* 70: 253-67, 2001

Madeb R., Messing E.M. Gender, racial and age differences in bladder cancer incidence and mortality. *Urol Oncol.* 22:86-92, 2004

Macklis, J.D. and Madison R.D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status:a fluorescence scale of membrane integrity. *J. Neurosci.Methods* 31:43-46, 1990

Marchand LL, Kolonel LN, Wilkens LR, *et al.*: Animal fat consumption and prostate cancer: a prospective study in Hawaii. *Epidemiology* 5:276–82, 1994

Markovic O and Markovic N: Cell cross-contamination in cell cultures: the silent and neglected danger. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 34:1- 8, 1998

Marcus PM, Hayes RB, Vineis P, Garcia-Closas M, Caporaso NE, Autrup H, *et al.*: Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 acetylation status, and bladder cancer risk: a case-series meta-analysis of a gene-environment interaction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9: 461–467, 2000

Masters JR, Thomson JA, Daly-Burns B, Reid YA, Dirks WG, Packer P et al: Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8012, 2001

Matzkin H, Soloway MS. Cigarette smoking: a review of possible associations with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Prostate* 122: 277–90, 1993

Mercedes Mari´n-Aguileraa, Lourdes Menguala, Mari´a Jose´ Ribala, Moise`s Burseta, Yolanda Arceb, Elisabet Arsb, Artur Oliverb, Humberto Villavicenciob, Ferran Algabab, Antonio Alcaraz. Utility of a multiprobe fluorescence in situ hybridization assay in the detection of superficial urothelial bladder câncer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 173:131-135, 2007

Metts MC, Metts JC, Milito SJ, Thomas CR, Jr. Bladder cancer: a review of diagnosis and management. *J Natl Med Assoc.* 92: 285–294, 2000

M Gallucci, F Guadagni, R Marzano, C Leonardo, R Merola, S Sentinelli, E M Ruggeri, R Cantiani, I Sperduti, F de la Iglesia Lopez, A M Cianciulli Status of the p53, p16, RB1, and HER-2 genes and chromosomes 3, 7, 9, and 17 in advanced bladder cancer: correlation with adjacent mucosa and pathological parameters. *J Clin Pathol* 58:367–371, 2005

Mhaweck-Fauceglia P, Zhang S, Terracciano L, Sauter G, Chadhuri A, Herrmann FR, Penetrante R.: Prostate-specific membrane antigen (PSMA) protein expression in normal and neoplastic tissues and its sensitivity and specificity in prostate adenocarcinoma: an immunohistochemical study using mutiple tumour tissue microarray technique. *Histopathology* 50:472-83, 2007

Mistry K, Cable G. Meta-analysis of prostatespecific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate carcinoma. *J AmBoard Fam Pract.* 16:95-101, 2003

Mitra AP et al.: Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *J. Clin. Oncol.* 24:5552-64, 2006

Montironi R, Lopez-Beltran A, Mazzucchelli R, Bostwick DG. Classification and grading of the non-invasive urothelial neoplasms: recent advances and controversies. *J Clin Pathol*. 56:91-5, 2003

Morin D, Barthelemy S, Zini R, et al. Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation. *FEBS Lett* 495:131-136, 2001

Moorthy HK, Venugopal P. Strategies for prostate cancer prevention: Review of the literature. *Indian J Urol*. 24: 295-302, 2008

Mukta M. Webber and Donna Chaproniere- Rickenberg. Spermine oxidation products are selectively toxic to fibroblasts in cultures of normal human prostatic epithelium. *Cell Biology Int Reports* 4: 185-192, 1980

Nahi H, Merup M, Lehmann S, Bengtzen S, Möllgård L, Selivanova G, Wiman KG, Paul C. PRIMA-1 induces apoptosis in acute myeloid leukaemia cells with p53 gene deletion. *Br J Haematol*. 132:230-6, 2006

Nayak SK, Dillman RO. Establishment of multiple tumor cell lines from a patient with melanoma: A simple method to control fibroblast growth. *Clinical Biotechnology* 3:237-242, 1991

Nelson-Rees WA, Daniels DW and Flandermeyer RR: Cross-contamination of cells in culture. *Science* 212: 446, 1981

Ozaki K, Kawata Y, Amano S and Hanazawa S: Stimulatory effect of curcumin on osteoclast apoptosis. *Biochem Pharmacol* 59: 1577-81, 2000

Pack RS. Epidemiology of prostate cancer: with emphasis on familial clusters. *Cancer Bull*. 45:384-389, 1993

Park C, Kim GY, Kim GD, Choi BT, Park YM, Choi YH.: Induction of G2/M arrest and inhibition of cyclooxygenase-2 activity by curcumin in human bladder cancer T24 cells. *Oncol Rep* 15:1225-31, 2006

Parkin DM, Bray FI, Devesa SS.: Cancer burden in the year 2000: the global picture. Eur J Cancer 37: S4–66, 2001

Parson W, Kirchebner R, Mühlmann R, Renner K, Kofler A, Schmidt S et al: Cancer cell line identification by short tandem repeat profiling: power and limitations. FASEB J 19: 434, 2005

Pienta KJ, Esper PS.: Risk factors for prostate cancer. Ann Intern Med 118:793–803, 1993

Philip S, Bulbule A, Kundu GC. Matrix metalloproteinase-2: mechanism and regulation of NF-kappaB-mediated activation and its role in cell motility and ECM-invasion. Glycoconj J. 21:429 – 441, 2004

Pollack JD, Williams MV, McElhaney RN.: The comparative metabolism of the *Mollicutes* (*Mycoplasmas*): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. Crit Rev Microbiol 23: 269-354, 1997

Powell IJ. Prostate cancer in the African American: is this a different disease? Semin Urol Oncol 16:221-6, 1998

Pycha A, Lodde M, Comploj E, Negri G, Egarter-Vigl E, Vittadello F, Lusuardi L, Palermo S, Mian C. Intermediate-risk urothelial carcinoma: an unresolved problem? Urology 63:472-5, 2004

Ramsewak RS, DeWitt DL and Nair MG: Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa*. Phytomedicine 7: 303-8, 2000

Razin S, Yogev D, Naot Y: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol Mol Biol Rev 62:1094-1156, 1998

Robbins RS (editor). Pathologic Basis of Disease. 7th ed. WB Saunders, Filadélfia EUA, 2004

Robinson, L.B.; Wichelbrausen, R.H.; Razinan, B.: Contamination of human cell cultures by pleuropneumonia organisms. *Science* 124:1147-8, 1956

Roehl KA, Loeb S, Antenor JA, Corbin N and Catalona WJ: Characteristics of patients with familial versus sporadic prostate cancer. *J Urol* 176:2438, 2006

Ross DT, Perou CM: A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines. *Dis Markers* 17:99-109, 2001

Sandhu C, Peehl DM, Slingerland J.: p16INK4A mediates cyclin dependent kinase 4 and 6 inhibition in senescent prostatic epithelial cell. *Cancer Res* 60:2616-2622, 2000

Schwab TS, Stewart T, Lehr J, Pienta KJ, Rhim JS, Macoska JA.: Phenotypic characterization of immortalized normal and primary tumor-derived prostate epithelial cell cultures. *Prostate* 44:164–171, 2000

Scott DW, Loo G.: Curcumin-induced GADD153 gene up-regulation in human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 25:2155-2164, 2004

Senthamil R. Selvan , Andrew N. Cornforth, Nagesh P. Rao, Yvonne A. Reid, Patric M. Schiltz, Ray P. Liao, David T. Price, F. Scott Heinemann, Robert O. Dillman.: Establishment and characterization of a human primary prostate carcinoma cell line, HH870. *The Prostate* 63: 91-103, 2005

Shahriar Koochekpour, Grace A. Maresh, Adrienne Katner et al. Establishment and characterization of a primary androgen-responsive African-American prostate cancer cell line, E006AA. *The Prostate* 60: 141-152, 2004

Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: The story so far. *Eur J Cancer* 41:1955-1968, 2005

Shen C, Meijia Gu, Ci Song, Lixia Miao et al. The tumorigenicity diversification in human embryonic kidney 293 cell line cultured *in vitro*. *Biologicals* 36:263-268, 2008

Sherr, C. J.D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.* 20:187-90, 1995

Shi H, Lambert JM, Hautefeuille A, Bykov VJ, Wiman KG, Hainaut P, de Fromental CC.: In vitro and in vivo cytotoxic effects of PRIMA-1 on hepatocellular carcinoma cells expressing mutant p53ser249. *Carcinogenesis* 29:1428-1434, 2008

Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, et al.: Cancers of the prostate and breast among Japanese and White immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* 63:963-966, 1991

Sievert KD, Amend B, Nagele U, Schilling D, Bedke J, Horstmann M, Hennenlotter J, Kruck S, Stenzl A. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J Urol*, 2009

Singh S, Khar A.: Biological effects of curcumin and its role in cancer chemoprevention and therapy. *Anti-Cancer Agents in medical Chemistry* 6:259-270, 2006

Skacel M, Ormsby AH, Pettay JD, Tsiftsakakis EK, Liou LS, Klein EA, Levin HS, Zippe CD, Tubbs RR. Aneusomy of chromosomes 7, 8, and 17 and amplification of HER-2/neu and epidermal growth factor receptor in Gleason score 7 prostate carcinoma: A differential fluorescent in situ hybridization study of Gleason pattern 3 and 4 using tissue microarray. *Hum Pathol* 32:1392–1397, 2001

Smith A, Mowles J. Prevention and control of mycoplasma infection of cell cultures: Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. San Diego: Academic Press 445-451, 1996

Spiro M. Konstantinov, Aleksandar Kostovski, Martin R. Berger. Will Human urinary bladder carcinoma respond to treatment with alkylphosphocholines and curcumin? *Facta Universitatis. Series: Medicine and Biology* 9: 70-73, 2002

Srougi M. Câncer de bexiga em dó menor. Disponível em: http://www.unifesp.br/dcir/urologia/uronline/ed1000/ca_bexiga.htm. Acesso em: 14 set. 2007

Stone KR, Micky DD, Wunderli H, Mickey GH, Pailson DF.: Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU145). *Int J Cancer* 21:274–281, 1978

Sui X, Shin S, Zhang R, Firozi PF, Yang L, Abbruzzese JL, Reddy SA.: Hdm2 is regulated by K-Ras and mediates p53-independent functions in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 28:709-20, 2009

Supiot S, Zhao H, Wiman K, Hill RP, Bristow RG.: PRIMA-1(met) radiosensitizes prostate cancer cells independent of their MTP53-status. *Radiother Oncol.* 86:407-11, 2008

Thangapazham RL, Shaheduzzaman S, Kim KH, Passi N, Tadese A, Vahey M, Dobi A, Srivastava S, Maheshwari RK.: Androgen responsive and refractory prostate cancer cells exhibit distinct curcumin regulated transcriptome. *Cancer Biol Ther.* 9: 4-7, 2008

Thacker J, Webb MB and Debenham PG: Fingerprinting cell lines: use of human hypervariable DNA probes to characterize mammalian cell cultures. *Somat Cell Mol Genet* 14: 519, 1988

IARC TP53 Database. Disponível em: < <http://www-p53.iarc.fr/p53main.html>>. Acesso em: 11 fev. 2009.

Theodorescu D. Molecular pathogenesis of urotelial bladder cancer. *Histpatol*18:259-274, 2003

Tsugane S, Gotlieb SL, Laurenti R, et al.: Cancer mortality among Japanese residents of the city of Sao Polo, Brazil. *Int J Cancer.* 45: 436-439, 1990

United States Preventive Services Task Force. Screening for Bladder Cancer: Guide to Clinical Preventive Services. 2ed., 2007

Varella-Garcia M, Akduman B, Sunpaweravong P, Di Maria MV, Crawford ED. The UroVysion fluorescence in situ hybridization assay is an effective tool for monitoring recurrence of bladder cancer. *Urol Oncol* 22:16-9, 2004

Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A.: Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci.* 30:43 – 52, 2005

Zhang W, Behringer RR, Olson EM: Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev* 9:1388-1399, 1995

Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG: ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARFINK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 92:725-734, 1998

Waites KB, Bébéar CM, Robertson JA, Talkington DF, Kenny GE: Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. Cumitech Eds. ASM press 34:1-29, 2001

Wang T, et al.: PRIMA-1 induces apoptosis by inhibiting JNK signaling but promoting the activation of Bax. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 352:203–212, 2007

Webber M, Bello D, Quader S.: Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications Part 2. Tumorigenic cell lines. *Prostate Review* 30:58-64, 1997

Wu AK, Cooperberg MR, Sadetsky N, *et al.* Health related quality of life in patients treated with multimodal therapy for prostate cancer. *J Urol.*180:2415-2422, 2008

Wu X-R.: Urothelial tumorigenesis: A tale of divergent pathways. *Nat Ver Cancer* 5:713-725, 2005

Yadav VS, Mishra KP, Singh DP, Mehrotra S, Singh VK.. Immunomodulatory effects of curcumin. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 27:485 – 497, 2005

Yamori T: Panel of human cancer cell lines provides valuable database for drug discovery and bioinformatics. *Cancer Chemother Pharmacol* 52:74-9, 2003

Yates DR, Rehman I, Meuth M, et al: Methylation analysis: A prospective study of bladder cancer patients and age stratified benign controls. *Oncogene* 25:1984-1988, 2006

Apêndice

ISSN 1677-5538

International

Braz J Urol

Official Journal of the Brazilian Society of Urology

Official Journal of the Thai Urological Association

Volume 35, Number 3, May - June, 2009

Anti-neoplastic activity of curcumin in PCa cell lines. A) Expression of prostate-specific membrane antigen. B) Cytokeratins, confirming the epithelial phenotype and prostate origin (Page 354).

XXXII Brazilian Congress of Urology
November 7 - 11, 2009 - Goiânia - GO - Brazil

Full Text Online Access Available
www.brazjurol.com.br
INDEXED BY
PubMed

An Evaluation of the Anti-neoplastic Activity of Curcumin in Prostate Cancer Cell Lines

Camila B. Piantino, Fernanda A. Salvadori, Pedro P. Ayres, Raphael B. Kato, Victor Srougi, Katia R. Leite, Miguel Srougi

Laboratory of Medical Investigation (CBP, FAS, PPA, RBK, VS, KRL, MS), Department of Urology, School of Medicine, Sao Paulo University, SP, Brazil, Laboratory of Surgical and Molecular Pathology (KRL), Sirio Libanes Hospital, Sao Paulo, and Genoa Biotechnology AS (KRL), Sao Paulo, SP, Brazil

ABSTRACT

Objective: The aim of our study is to investigate the anti-neoplastic effect of curcumin in prostate cancer cell lines. Specifically, we are using the LNCaP cell line and another prostate cell line developed in our laboratory, PcBra1. The PcBra1 cells were derived from a localized, obstructive prostate cancer with a Gleason score of 9 (4+5).

Materials and Methods: A prostate cancer cell line was isolated from a localized, obstructive prostate cancer with a Gleason score of 9 (4+5), and it was characterized using immunohistochemistry. After six passages, the new cell line was treated with varying doses of curcumin: 10 μ M, 25 μ M or 50 μ M. Apoptosis was detected by flow cytometry using Annexin V FITC. For comparison, the same experiment was performed using the well-established metastatic prostate cancer cell line, LNCaP.

Results: Increasing concentrations of curcumin promoted more apoptosis in the PcBra1 cells. Exposure to 10 and 25 μ M curcumin induced apoptosis in 31.9% and 52.2% of cells, respectively. Late apoptosis was induced in 37% of cells after treatment with 10 μ M curcumin and 35% of cells with a 25 μ M treatment. Necrosis accounted for less than 10% of the death in these cells at those two concentrations. When curcumin was used at 50 μ M, apoptosis was observed in 64.3% of the cells. Including late apoptosis and necrosis, 98.6% of the cells died in response to 50 μ M curcumin. Results with the LNCaP cells were similar although late apoptosis was the main phenomenon at 25 μ M.

Conclusion: We have shown that curcumin acts on localized prostate cancer to induce apoptosis and may therefore be an option as a future therapeutic agent.

Key words: curcumin; curcuma longa; prostate cancer; apoptosis

Int Braz J Urol. 2009; 35: 354-61

INTRODUCTION

Prostate cancer (PC) is the most common cancer in Brazilian men and the second leading cause of death. The annual incidence of prostate cancer in Brazil continues to rise, and 49,530 new cases were predicted for 2008 (1). Advanced prostate cancer is treated with anti-androgens, but after 2 to 3 years of

therapy, neoplasia often becomes hormone resistant and is usually no longer responsive to conventional chemotherapy. As a consequence, many prostate cancer patients are drawn toward alternative therapies (2). In fact, a majority of patients at major medical centers are now combining their conventional therapies with some form of alternative and complementary medicine, the most popular of which involve nutri-

tional modifications and the use of herbal and other micronutrients (3).

Curcumin [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxy phenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] is a phenolic compound and is the main ingredient of *Curcuma longa*. It is extracted as a yellow pigment from the rhizome, which has been used extensively in curries and mustards. Anti-inflammatory, anti-oxidant, and anti-septic effects of curcumin have been reported (4). Curcumin seems to elicit positive results in such a wide variety of ways because of its capability to act as free radical scavenger (5). Additionally, curcumin can alter the gene expression patterns of various stress-induced proteins and genes involved in angiogenesis (6). Finally, curcumin can inhibit the activity of many important transcription factors, such as NFkB and AP-1 (7). The effects of curcumin depends on its concentration. At 10 μ M, it acts as an anti-oxidant (8), and at 50 μ M it generates superoxide radicals and induces apoptosis (9). The aim of our study was to examine the anti-neoplastic effect(s) of curcumin in two prostate cancer cell lines, LNCaP and a prostate cell line developed in our laboratory from a localized, obstructive, androgen-independent prostate cancer with a Gleason score of 9(4+5).

MATERIALS AND METHODS

Materials

Culture medium consisted of RPMI-1640 supplemented with fetal bovine serum (FBS), streptomycin, and penicillin (all from GIBCO, Rockville, MD, USA). Curcumin was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). A 100 mM stock solution was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) and stored at 4°C. Fresh solutions were made by diluting the stock into cell culture medium immediately before use. Annexin V FITC and Propidium Iodide (PI) were purchased from BD-Pharmingen (San Jose, CA, USA) and Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA) respectively.

LNCaP Cell Culture

The LNCaP (FGC clone) cells were obtained from American Type Culture Collection (Rockville,

MD, USA) and were cultivated in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, streptomycin 100 mg/mL, and penicillin 100 U/mL at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator.

Establishment of Cell Line

The PcBra1 prostate adenocarcinoma cell line was established from a 62-year-old white male, who underwent a transurethral resection in August 2006 for an obstructive, androgen-independent cancer with a Gleason score of 9(4+5). Specimens of the prostate adenocarcinoma were obtained immediately after the resection and transported in RPMI-1640 medium. The tissue was sectioned and digested using type VIII collagenase at 0.56 mg/mL (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Cell suspensions were subdivided into 25 cm² tissue culture flasks containing RPMI-1640 supplemented with 10% FBS, streptomycin (100 mg/mL), and penicillin (100 U/mL) in a 5% CO₂ humidified incubator. The medium was changed twice weekly or until a confluent monolayer was established. At the time of confluence, adherent cells were subcultured after detachment using trypsin/EDTA (0.25% trypsin-1.0mM ethylenediaminetetraacetate).

In order to eliminate fibroblast contamination, we submitted the cell culture to (1) nutritional starvation (S) and (2) cell differential attachment (DA):

1. Nutritional Starvation (s)

Tumor cell colonies were exposed to media with a reduced concentration of serum. Serum reduction was gradual, starting with 10%, then 5%, 2.5%, and finally 1%. Incubation with each concentration of serum lasted about 1 week. The last step (1% FBS) was continued until dense tumor cell colonies became evident.

2. Differential Attachment (DA)

Tumor cell colonies were trypsinized, resuspended in 10 mL of media (10% FBS), reseeded and incubated for 15 minutes in the original flask (first cycle). At the end of the first cycle, nonadherent cells were transferred to a new flask, which was incubated for an additional 15 minutes (second cycle). The first

flask was mostly composed of fibroblasts, while the last flask contained mostly tumor cells. At confluence, if the fibroblasts were not totally eliminated, the cell growth from the 4th cycle was harvested, and the entire procedure was repeated.

Characterization of Cell Culture by Immunocytochemistry

The primary cancer cell culture PCBra1 was characterized as prostate primary by immunocytochemistry using anti-Prostate Specific Membrane Antigen (clone P, dilution 1:100; Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) and pan-cytokeratins (Dilution 1:100, Dako, Glostrup, Denmark) antibodies. To certify the absence of fibroblast and endothelial cell contamination, anti-desmin (clone D33, dilution 1:100; Dako, Glostrup, Denmark) and anti-factor VIII (clone F8/86, dilution 1:400; Dako, Glostrup, Denmark) antibodies were also utilized to stain these cells. Briefly, cells were recovered from culture flasks using a cell scraper and fixed in 70% alcohol following a 900 g centrifugation for 5 minutes at room temperature. The cyto-centrifugate was impressed on adhesive coated slides and incubated overnight at 4°C with the antibodies mentioned above. Next, biotinylated anti-mouse immunoglobulin G was applied at a 1:200 dilution for 60 minutes at room temperature. Slides were rinsed with PBS for 30 minutes, incubated with peroxidase-conjugated streptavidin (streptABC Kit, Dako, Glostrup Denmark) at a 1:400 dilution in PBS for 45 minutes at room temperature, and rinsed with PBS for 30 minutes. Color was developed by incubating the slides with 0.06% diaminobenzidine in PBS for 15 minutes. Slides were then rinsed in tapwater, counterstained with Harris hematoxylin, dehydrated, coverslipped, and reviewed under a light microscope.

Chemosensitivity Studies

PCBra1 from passage 6 and LNCaP cell cultures (2×10^5 /mL) were incubated with curcumin at 10 μ M, 25 μ M and 50 μ M for 24 h. After incubation, cells were harvested and resuspended with 100 μ L of buffer solution (10 mM Hepes; 150 mM NaCl; 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1.8 mM $CaCl_2$, pH=7.4). Annexin V FITC (dilution 1:500, BD-Pharmingen,

San Jose, CA, USA) was added and the suspension was incubated for 20 minutes at room temperature. To perform a double stain, 400 μ L of buffer and 40 μ L of PI (SigmaChemical, St. Louis, MO, USA) were added to the sample. The percentage of cells in apoptosis and necrosis was determined by flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA). Ten thousand events were analyzed using the Cell Quest Pro software (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA).

RESULTS

The PCBra1 cell line was derived from an obstructive, androgen-independent prostate adenocarcinoma. The tumor was confirmed to be a prostate epithelial cell malignancy through positive staining for PSMA and cytokeratin. To aid in the analysis, and exclude the possibility of fibroblast contamination we also used antibodies for anti-desmin and anti-factor VIII, which specifically stain for fibroblasts and endothelial cells, respectively (Figure-1). PCBra1 stained negatively for these markers. The generation time (g) was calculated using the formula $n = (3.32 \log X_f / X_i) / (T_f - T_i)$, being $g = 1/n$, and for PCBra1 the doubling time was 50 h. The cariotype revealed that the majority of cells were aneuploid and the most frequent occurrence was loss of chromosomes. We also performed studies in PCBra1 cells to examine the chemosensitivity to increasing curcumin concentrations. For comparison, we also studied the ability of curcumin to induce cell death in a well-established prostate cancer cell line LNCaP, derived from a metastatic prostate carcinoma to a lymph node, androgen-dependent. As shown in Figure-2A, Annexin V positive cells (R1) were characterized as apoptotic cells. PI positive cells (R4) were considered necrotic, and double stained cells (R2) were labeled as late apoptotic cells.

Our results revealed that PCBra1 cell viability decreases in response to the three increasing concentrations of curcumin tested (Figure-2B). Exposure of the cells to 10 μ M or 25 μ M curcumin induced apoptosis in 31.9% and 52.2% of cells, respectively. Those same concentrations led to late apoptosis in 37% and 35% of cells. The number of cells undergoing necrosis

Figure 1 – Immunocytochemistry results of PcBra1 cell line. A) Expression of PSMA. B) Cytokeratins, confirming the epithelial phenotype and prostate origin. Vimentin and desmin were negative eliminating the possibility of fibroblast or endothelial cell contamination.

was lower, less than 10% at the two concentrations mentioned above. When curcumin was used at 50 μ M, apoptosis was the most common process identified, as 64.3% of cells seemed to be dying by apoptosis. Late apoptosis was the next most common form of death, as 34% of the cells were classified this way. Overall, 98.6% of the cells were dying, and necrosis only accounted for 0.35% of this cell population.

Analysis of LNCaP cells also showed enhanced apoptosis and a decrease in necrosis after treatment with increasing concentrations of curcumin. As shown in Figure-2B, at 50 μ M curcumin, almost 90% of the cells were undergoing apoptosis. However, in contrast to the behavior of the PcBra1 cells, the LNCaP cells in late apoptosis continued to increase, reaching 63% with 25 μ M curcumin. At 50 μ M, the late apoptotic population was reduced to 9% of the cells.

COMMENTS

In this study, we investigated the anti-neoplastic effect of curcumin on a prostate cancer cell line developed in our laboratory. We call this line PCBra1, and it originated from a localized PC. The results of our study demonstrate that at concentrations of 10 μ M, 25 μ M and 50 μ M, curcumin induced apoptosis

in increasing proportions of cells: 31.9%, 52.2% and 64.3% respectively. The percentage of cells undergoing necrosis was lower, less than 10%, and the amount of cells in late apoptosis was variable between 34.0% and 37.0%, with an overall cell death of 98.6%. When we compared these results to a metastatic cell line of PC, LNCaP, the results were very similar. More tumor cells underwent apoptosis as the concentration of curcumin increased. At 50 μ M, almost 90% of the cells had undergone apoptosis.

Curcumin induces apoptosis through ROS-dependent pathway, caspase activation and inhibiting Bcl-2 family members (10). One intriguing fact that we have observed in this study was a decreasing number of necrotic cells as long as the apoptosis rises under increasing concentrations of curcumin. We can hypothesize that curcumin could be acting over other proteases than caspases, not yet characterized, that under lower concentration lead to necrosis as an alternative of apoptosis. This should be motive of further studies.

These results identify similarities in the behavior of the two cell lines. It is important to mention that the cell line established by us, PCBra1, was derived from an obstructive, localized, androgen-independent prostate adenocarcinoma, while the LNCaP cells are originally from a metastatic site and androgen-dependent prostate cancer. DU-145 and

Figure 2 – Curcumin effects on cell viability. LNCaP and PcBra1 were incubated with or without curcumin and stained with Annexin V-FITC and Propidium Iodide (PI) followed by flow cytometry analysis. A) Schematic representation of results: R1=cells marked with Annexin (apoptosis), R2=cells marked with Annexin and PI (late ptosis), R3 = no marked cells (viable) and R4=cells stained with PI (necrosis). B) Percentage of cells in apoptosis, late apoptosis and necrosis after treatment with increasing concentrations of curcumin for 24 hours.

PC-3 cells are other classical prostate cancer cell lines (11-13) used in the majority of in vitro investigations, and they also originated from metastatic sites. While it is true that these classical cell lines have been helpful in understanding advanced stages of the disease, the establishment and characterization of a localized prostate carcinoma cell line remains very important, since it represents a different stage and behavior of this particular neoplasia. The few cell lines that were isolated from primary prostate carcinoma tissues and have been characterized in the literature were found to actually be derivatives of other metastatic prostate cancer cell lines (e.g., ND-1 from DU-145) (14,15) or contamination of other cell types (PEAZ-1 in HT-1080) (16,17). Moreover, the differences among various populations and racial differences in prostate cancer justify the necessity for the establishment and characterization of human prostate tumor cell lines from Brazilian patients for further experiments with different drugs and molecules.

Dorai et al. (18) examined the effect of curcumin on EGF receptor signaling in the androgen-sensitive LNCaP and androgen-insensitive PC-3 cell lines. They found that curcumin was a potent inhibitor of EGF-R signaling, and it accomplished this effect in three different ways: (1) down-regulation the EGF-R protein; (2) inhibition of the intrinsic EGF-R tyrosine kinase activity; and (3) inhibition of ligand-induced activation of the EGF-R. This group concludes that curcumin can induce apoptosis in this model by interfering with the signal transduction pathways of a prostate cancer cell.

Curcumin is a phenolic compound, and it is the major ingredient in the rhizome of the herb *Curcuma longa*. The use of turmeric as a medicinal compound dates back to around 2000 BC when it was used as an anti-inflammatory agent. With time, more and more of its medicinal uses were discovered, and today, curcumin is associated with a plethora of beneficial effects on human health. Most recently, curcumin has been used as an anti-inflammatory, anti-mutagenic (19), and anti-cancer substance (20). It works as an anti-oxidant and is capable of inducing apoptosis (21,22).

The possible mechanisms responsible for the induction of apoptosis by curcumin are varied, including effects on the stability and super-expres-

sion of p53 (23), the release of cytochrome c, and the induction of reactive oxygen intermediates (24). It has previously been described that curcumin can suppress NF- κ B, Akt, AP-1 or JNK. It can also affect gene expression; curcumin can up-regulate the genes related to the DNA damage response (25) and down-regulate genes related to cell survival, such as *egr-1*, *c-myc*, and *bclX(L)*. Shankar et al. (26) have recently shown that curcumin inhibits growth and induces apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cancer cells by downregulating the expression of Bcl-2 and Bcl-XL and upregulating the expression of p53, Bax, Bak, PUMA, Noxa, and Bim. Curcumin also affected p53 by modulating its phosphorylation at serine 15 and its acetylation in a concentration-dependent manner.

In conclusion, we have shown that curcumin is a substance that can act in cells isolated from localized PC, inducing apoptosis as it does in metastatic cell lines. Pathways involved in this phenomenon are not yet clarified, and the next steps of our study will address some of these questions. At this time, we can speculate that curcumin or its components could be used to treat localized or metastatic prostate cancer, and further studies should be performed to elucidate the specific mechanism by which curcumin is able to induce some of these anti-cancer phenotypes.

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

REFERENCES

1. Available at: <http://www.inca.gov.br>
2. Moyad MA: Alternative therapies for advanced prostate cancer. What should I tell my patients? *Urol Clin North Am.* 1999; 26: 413-7.
3. Denis L, Morton MS, Griffiths K: Diet and its preventive role in prostatic disease. *Eur Urol.* 1999; 35: 377-87.
4. Hergenbahn M, Soto U, Weninger A, Polack A, Hsu CH, Cheng AL, et al.: The chemopreventive compound curcumin is an efficient inhibitor of Epstein-Barr virus BZLF1 transcription in Raji DR-LUC cells. *Mol Carcinog.* 2002; 33: 137-45.

5. Kato K, Ito H, Kamei K, Iwamoto I: Stimulation of the stress-induced expression of stress proteins by curcumin in cultured cells and in rat tissues in vivo. *Cell Stress Chaperones*. 1998; 3: 152-60.
6. Mohan R, Sivak J, Ashton P, Russo LA, Pham BQ, Kasahara N, et al.: Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. *J Biol Chem*. 2000; 275: 10405-12.
7. Woo MS, Jung SH, Kim SY, Hyun JW, Ko KH, Kim WK, et al.: Curcumin suppresses phorbol ester-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting the PKC to MAPK signaling pathways in human astrogloma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 335: 1017-25.
8. Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, et al.: Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res*. 2001; 21: 2895-900.
9. Orlowski RZ, Baldwin AS Jr: NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med*. 2002; 8: 385-9.
10. Skommer J, Wlodkowic D, Pelkonen J: Cellular foundation of curcumin-induced apoptosis in follicular lymphoma cell lines. *Exp Hematol*. 2006; 34: 463-74.
11. Schmelz M, Cress AE, Barrera J, McDaniel KM, Davis TL, Fuchs L, et al.: PEAZ-1: a new human prostate neoplastic epithelial cell line. *Prostate*. 2001; 48: 79-92. Erratum in: *Prostate*. 2004; 61: 375.
12. Erratum: Monika Schmelz, Anne E. Cress, Jean Barrera, Kathy M. McDaniel, Tracy L. Davis, Laura Fuchs, Bruce L. Dalkin, Raymond B. Nagle. PEAZ-1: A new human prostate neoplastic epithelial cell line. *Prostate* 2001;48:79-92. *Prostate*. 2004; 61: 375.
13. Rhim JS: In vitro human cell culture models for the study of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2000; 3: 229-235.
14. Ko D, Gu Y, Yasunaga Y, Nakamura K, Srivastava S, Moul JW, et al.: A novel neoplastic primary tumor-derived human prostate epithelial cell line. *Int J Oncol*. 2003; 22: 1311-7.
15. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, et al.: Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*. 1997; 15: 356-62.
16. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al.: PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997; 275: 1943-7.
17. Isaacs WB, Carter BS, Ewing CM: Wild-type p53 suppresses growth of human prostate cancer cells containing mutant p53 alleles. *Cancer Res*. 1991; 51: 4716-20.
18. Dorai T, Gehani N, Katz A: Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer. II. Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor and depletes the protein. *Mol Urol*. 2000; 4: 1-6.
19. Stoner GD, Mukhtar H: Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J Cell Biochem Suppl*. 1995; 22: 169-80.
20. Kuttan R, Bhanumathy P, Nirmala K, George MC: Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Lett*. 1985; 29: 197-202.
21. Kuo ML, Huang TS, Lin JK: Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1317: 95-100.
22. Khar A, Ali AM, Pardhasaradhi BV, Begum Z, Anjum R: Antitumor activity of curcumin is mediated through the induction of apoptosis in AK-5 tumor cells. *FEBS Lett*. 1999; 445: 165-8.
23. Scott DW, Loo G: Curcumin-induced GADD153 gene up-regulation in human colon cancer cells. *Carcinogenesis*. 2004; 25: 2155-64.
24. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC: Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*. 2003; 23: 363-98.
25. Han SS, Chung ST, Robertson DA, Ranjan D, Bondada S: Curcumin causes the growth arrest and apoptosis of B cell lymphoma by downregulation of egr-1, c-myc, bcl-XL, NF-kappa B, and p53. *Clin Immunol*. 1999; 93: 152-61.
26. Shankar S, Srivastava RK: Involvement of Bcl-2 family members, phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT and mitochondrial p53 in curcumin (diferulolylmethane)-induced apoptosis in prostate cancer. *Int J Oncol*. 2007; 30: 905-18.

*Accepted after revision:
January 21, 2009*

Correspondence address:

Dr. Katia Ramos Moreira Leite
Rua Dona Adma Jafet, 91
São Paulo, SP, 01308-050, Brazil
Fax: +55 11 3231-2249
E-mail: katiaramos@uol.com.br

EDITORIAL COMMENT

An amazing number of papers investigating the actions, mechanisms and clinical effects of curcumin, an old Indian spice, have been published over the last 15 years. Curcumin belongs to the so called polyphenolic compounds extracted from the plants that were used for medications since a long time ago. An exceptional property of curcumin seems to be its real beneficial effect in many different diseases which sometimes is hard to apprehend. How can it be, that curcumin is neuron-protective, acting anti-apoptotic, so that it can be considered as Alzheimer-preventing stuff on one hand, and induces apoptosis of cancer cells, on the other hand, while normal, healthy cells remain inviolate? Is curcumin one of “God’s blessings” for our life?

The issue is a complex one, as more than 40 different targets of curcumin have been documented including enzymes, growth and transcription factors, protein kinases and chemokines (1). Therefore, a reasonable rationale for its action is still to be established. This is due to the fact that most targets described so far are secondary cellular response maskers which do not directly interact with curcumin. Noteworthy, is the recent paper by Santel et al. (2) which has added “the first line target” to the plethora of curcumin’s actions. Inhibition of glyoxalases, involved in glycolytic pathway could be an explanation for curcumin’s bias to target cancer cells.

In this regard, Piantino et al. presented important pre-clinical studies, demonstrating for the first time, to the best of my knowledge, the effect of curcumin on the primary prostate cancer cells. The authors clearly demonstrated that curcumin within

a concentration range between 10 to 50 μ M induces cell death primarily through apoptosis. Additionally, the authors showed the process of how to test primary cancer cells for their susceptibility to interact with a drug. In combination with biopsies, such a procedure can be applied for selection of the most potent chemotherapeutics having the lowest side effects. In this line, this plant-derived mysterious substance could be advantageous over known registered anti-tumor drugs. This warrants further clinical studies to compare such nutraceuticals as curcumin with other therapeutic approaches.

However, one of the important questions to be addressed is “how to bring curcumin at such micromolar concentrations to the site of tumors”. Maybe, new formulations with liposomes or nano-encapsulation are likely to bring this promising natural product to the top of therapeutic agents (3).

REFERENCES

1. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H: Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 595: 1-75.
2. Santel T, Pflug G, Hemdan NY, Schäfer A, Hollenbach M, Buchold M, et al.: Curcumin inhibits glyoxalase 1: a possible link to its anti-inflammatory and anti-tumor activity. *PLoS ONE.* 2008; 3: e3508.
3. Wang D, Veena MS, Stevenson K, Tang C, Ho B, Suh JD, et al.: Liposome-encapsulated curcumin suppresses growth of head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in xenografts through the inhibition of nuclear factor kappaB by an AKT-independent pathway. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 6228-36.

Dr. Gerd Birkenmeier

Institute of Biochemistry

School of Medicine, University of Leipzig

Leipzig, Germany

E-mail: Gerd.Birkenmeier@medizin.uni-leipzig.de

EDITOR'S COMMENT

Anti-neoplastic Activity of Curcumin in PCa

The May – June 2009 issue of the International Braz J Urol presents important contributions from different countries, and as usual, the editor's comment highlights some papers.

Doctor Leite and co-investigators, from Laboratory of Medical Investigation, Sao Paulo University, SP, Brazil, investigated on page 354 the anti-neoplastic effect of curcumin in prostate cancer cell lines. Specifically, they used the LNCaP cell line and another prostate cell line developed in their own laboratory, PcBra1. A prostate cancer cell line was isolated from a localized prostate cancer with a Gleason score of 9 (4+5). After six passages, the new cell line was treated with varying doses of curcumin. Apoptosis was detected by flow cytometry using Annexin V FITC. For comparison, the same experiment was performed using the well-established metastatic prostate cancer cell line, LNCaP. Increasing concentrations of curcumin promoted more apoptosis in the PcBra1 cells. Exposure to 10 and 25 μ M curcumin induced apoptosis in 31.9% and 52.2% of cells, respectively. Late apoptosis was induced in 37% of cells after treatment with 10 μ M curcumin and 35% of cells with a 25 μ M treatment. Necrosis accounted for less than 10% of the death in these cells at those 2 concentrations. When curcumin was used at 50 μ M, apoptosis was observed in 64.3% of the cells. In conclusion, the authors have shown that curcumin acts on localized prostate cancer to induce apoptosis and may therefore be an option as a future therapeutic agent. Dr. Gerd Birkenmeier, from Institute of Biochemistry, School of Medicine, University of Leipzig, Germany, provided an interesting editorial on this research.

Doctor Lang and co-workers, from Downstate School of Medicine, Brooklyn, NY, USA, studied on page 271 the efficacy of the intercostal versus subcostal access route for percutaneous nephrolithotripsy. Among 642 patients that underwent nephrolithotomy or nephrolithotripsy, a total of 127 had an intercostal access tract (11th or 12th rib) and 515 had a subcostal access tract. Considering the major complications found and the advantages that the intercostal access route offers to the surgeon, the authors concluded that it is reasonable to recommend its use after proper pre-procedural assessment of the anatomy, and particularly the respiratory lung motion. Dr. Evangelos Liatsikos, from University of Patras Medical School, Greece, Dr. Riccardo Autorino & Dr. Marco De Sio, from Second University of Naples, Italy and Dr. John Denstedt, from The University of Western Ontario, London, ON, Canada, all of them well-recognized experts in the field, provided important comments on this paper.

Doctor Mezentsev, from Harrogate and District NHS Foundation Trust, England, UK, performed on page 293 a systematic review and meta-analysis to compare non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and opioids in pain relief for extracorporeal shock wave lithotripsy (SWL) powered by an electromagnetic generator. Data from 3 trials (244 patients) were pooled. The primary outcome measure was adequate analgesia, defined as "if no additional pain relief was used". The difference in the proportion of patients with adequate anesthesia was compared between the NSAIDs and opioids groups as an odds ratio and

EDITOR'S COMMENT - *continued*

odds ratio were pooled across the 3 trials with a fixed effects model. It was found no statistically significant difference between using NSAIDs and opioids for pain relief during SWL using modern electromagnetic lithotripters. In conclusion, the analysis showed that in relieving pain during SWL using modern electromagnetic lithotripters NSAIDs are as effective as opioids. Dr Ayten Bilir, from Department of Anesthesiology & Reanimation, Osmangazi University Medical Faculty, Eskisehir, Turkey, commented on the paper.

Doctor Onal and colleagues, from Cerrahpasa School of Medicine, University of Istanbul, Turkey, assessed on page 326 the outcome of urologic evaluation in patients with voiding dysfunction due to multiple sclerosis (MS) and determined the relationship between urological and neurological parameters of these patients. They retrospectively reviewed the medical records of 249 patients (162 female and 87 male) with MS and with a median time of 4 years (range 3 months to 26 years) of MS onset. The authors concluded that the prevalence of mixed symptoms in patients with MS is higher than storage or voiding symptoms alone. Although detrusor overactivity and detrusor-sphincter dyssynergia were the most common urodynamic diagnoses, upper urinary tract deterioration was rarely found.

Doctor Sager and collaborators, from Hospital de Pediatria Dr. J.P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina, assessed on page 315 the role of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in congenital ureteropelvic junction obstruction at diagnosis and during postoperative follow-up. They conducted a case-control study including 19 patients (mean age of 6.7 years). Urinary TGF- β 1 and other markers were measured pre-, intra- and postoperatively. The authors found that the mean bladder urine TGF- β 1 concentration in obstructed patients prior to pyeloplasty was higher than in controls and concluded that measurement of urinary TGF- β 1 could become a useful tool for the diagnosis of obstructive hydronephrosis and the evaluation of the parenchyma function status, pre and postoperatively. Dr. Sarel Halachmi, from Technion Israeli Institute of Technology, Haifa, Israel, Dr. Osama M. Sarhan, from Mansoura University, Egypt, and Dr. Seth A. Alpert, from Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio, USA, provided interesting editorial comments on this paper.

Francisco J.B. Sampayo, M.D.
Editor-in-Chief