

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/08/2018.

**PAPEL DA PROLACTINA DURANTE
DESENVOLVIMENTO PROSTÁTICO EM RATOS:
AVALIAÇÃO DA MORFOGÊNESE GLANDULAR,
PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS
EPITELIAIS**

ANA CAROLINA LIMA CAMARGO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como requisito para a obtenção do grau de Mestre, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Prof. Doutor Luis Antonio Justulin Junior

**BOTUCATU – SP
2017**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**Título do Projeto: PAPEL DA PROLACTINA DURANTE
DESENVOLVIMENTO PROSTÁTICO EM RATOS:
AVALIAÇÃO DA MORFOGÊNESE GLANDULAR,
PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS
EPITELIAIS**

ANA CAROLINA LIMA CAMARGO

DOUTOR LUIS ANTONIO JUSTULIN JUNIOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como requisito para a obtenção do grau de Mestre, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Prof. Doutor Luis Antonio Justulin Junior

**BOTUCATU – SP
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Camargo, Ana Carolina Lima.

Papel da prolactina durante desenvolvimento prostático em ratos
: avaliação da morfogênese glandular, proliferação e diferenciação
das células epiteliais / Ana Carolina Lima Camargo. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luis Antonio Justulin Junior Capes:
20603002

1. Bromocriptina. 2. Prolactina. 3. Próstata - Doenças.
4. Morfogênese. 5. Células - Diferenciação. 6. Células -
Proliferação.

Palavras-chave: Bromocriptina; Desenvolvimento;
Prolactina; Próstata .

Botucatu, 22 de fevereiro de 2017

Banca Examinadora

Dr. Luis Antonio Justulin Junior (Orientador)

Assinatura

Dra. Silvana Gisele Pegorin de Campos

Assinatura

Dra. Arianne Leite Rozza

Assinatura

Dr. Sérgio Pereira

Assinatura

Dra. Bianca Gonçalves Facchim

Assinatura

“De todo o amor que eu tenho
Metade foi tu que me deu
Salvando minh'alma da vida
Sorrindo e fazendo o meu eu”
Dona Cila- Maria Gadú

À minhas avós, Magnólia e Maria Auxiliadora...
Dedico

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Lúcia, por sempre me incentivar e nunca me deixar desistir. Ao meu pai, Francisco, pelo “paitrocínio” e ajuda necessária para seguir essa carreira! Agradeço imensamente aos meus pais por toda ajuda, incentivo e paciência que, mesmo sem entender, acabam entendendo toda a correria e os fins de semana dedicados ao laboratório. Sou muito grata e espero um dia retribuir tudo que já me proporcionaram, pois sei do orgulho deles em terem contribuído para a formação da filha em uma universidade pública.

Aos meus irmãos Victor e Eduardo, que me incentivam e me ajudam sempre que necessário, e acabam por entender a irmã que “não trabalha, só estuda”!

Ao Prof, Dr. Luis Justulin, por toda paciência, dedicação, ensinamento desde a iniciação científica, e por aceitar fazer parte dessa longa caminhada como meu orientador. Espero que essa parceria continue por muitos anos e que possamos, além da relação de professor – aluna, um dia sermos companheiros de profissão.

A todos os professores e integrantes do Laboratórios de Matriz Extracelular (LabMec), por toda ajuda dentro e fora do laboratório, pela paciência e dedicação no dia-a-dia, afinal sabemos que a “Equipe LabMec” é sensacional! Principalmente aos pós-graduandos Alexandre (Pei), Flávia (Klo), Ketlin e Jaqueline, pois a pós-graduação não seria a mesma sem essas companhias, trocas de conhecimentos, brincadeiras e horas do café. Em especial ao Alexandre (Pei) pela co-orientação não oficial desde a iniciação científica, pelas brincadeiras. A Flávia (Klo), pois adorei a parceria do início ao fim do mestrado, e com certeza esse apoio fez toda a diferença. O mestrado nos aproximou e nos tornou algo além de colegas de laboratório. Muito obrigada pela ajuda e pelos conselhos do dia a dia.

Aos companheiros de almoço e agregados do LabMec, afinal, sem os agitados almoços, cafezinhos acompanhados de gordices e loucos churrascos, acredito que a loucura dessa vida acadêmica já teria tomado conta de mim.

Ao meu melhor amigo e eterno namorado Rian, por aturar todas as TPMs e estar sempre ao meu lado, me apoiando em todas as decisões! Sem a sua ajuda e apoio eu não seria capaz, afinal são 10 anos de MUITA parceria.

Em especial à D. Tera, pelo café e chá de todos os dias, as tardes de pipoca, pão e arroz doce, uma pessoa incrível que nos faz entender o significado: “Escolha um trabalho que você ame e não terá de trabalhar um único dia de sua vida” (Confúcio).

A minha querida *teacher* Helena Algapejev pelas deliciosas aulas de inglês que me proporcionam muito conhecimento para essa jornada.

“Conhecimento não é aquilo que você sabe, mas o que
você faz com aquilo que você sabe.”
Aldous Huxley

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
Capítulo 1	13
1- INTRODUÇÃO	14
1.1 Desenvolvimento Prostático	14
1.2 Prolactina	18
1.3 Prolactina e Próstata	23
2- Justificativa e relevância do tema.....	24
3- Objetivos	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
REFERÊNCIAS	26
Capítulo 2: Manuscript	27
Abstract.....	29
Introduction	30
Material and Methods.....	32
Results	35
Discussion.....	38
Conclusion.....	41
REFERENCES	42
ANEXOS.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AR- Receptor de Andr geno
BR- Bromocriptina
BR21- grupo bromocriptina no DPN21
BR35- grupo bromocriptina no DPN35
PRL21 grupo prolactina no DPN21
PRL35- grupo prolactina no DPN35
CaP- Câncer de próstata
CK- citoqueratinas
CT21- grupo controle no DPN21
CT35- grupo controle no DON35
DHT- Diidrotestosterona
DPN- dia pós-natal
DPN- 21- dia pós-natal 21
DPN- 35- dia pós-natal 35
E2- estrog no
HE- Hematoxilina e Eosina
HPB- Hiperplasia pr st tica benigna
JAK- Janus kinase 2
mRNA- RNA mensageiro
PDL- Próstata dorsolateral
PRL- Prolactina
PRLR- Receptor de prolactina
PV- Próstata ventral
STAT3- transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
STAT5- transdutor de sinal e ativador de transcrição 5
T- Testosterona

RESUMO

A próstata é uma glândula acessória do sistema genital masculino e, além da dependência androgênica para o seu desenvolvimento e homeostasia, é influenciada por hormônios não esteróides, entre eles a prolactina (PRL). Estudos em modelos animais demonstraram que a PRL pode atuar com efeito anabólico sobre a glândula prostática. Assim, nosso objetivo foi investigar os efeitos da modulação de PRL sobre o desenvolvimento e maturação da próstata ventral (PV) de ratos. Foram utilizados ratos machos *Sprague Dawley* (DPN 90) divididos em 6 grupos (n=6): Grupo controle (CT): receberam solução salina; Prolactina (PRL): Prolactina (0,3mg/kg); Bromocriptina (BR): inibidor de PRL (0,4mg/kg). Todos os animais foram submetidos diariamente (via subcutânea) do dia pós-natal 12 (DPN12) até os DPN 21 ou 35. Os animais foram anestesiados, pesados e posteriormente foram eutanasiados. O sangue e os lobos da PV foram coletados, pesados e processados para análises morfológicas, de western blot (WB) e RT qPCR. O tratamento com PRL induziu aumento de peso corpóreo dos animais no DPN35 comparado aos outros grupos. Histologicamente houve maior acúmulo de secreção no lúmen e diminuição do compartimento epitelial nos grupos PRL e BR comparados ao CT no DPN35. A reação imunohistoquímica para Ki67 demonstrou aumento de células proliferativas nos grupos tratados com PRL. A quantificação de PCNA confirmou estes dados, com aumento significativo no grupo PRL35. A intensidade de reação imunohistoquímica para AR foi maior no grupo PRL35. A quantificação de AR por WB confirmou esses dados. A expressão gênica do PRLR aumentou no DPN21, enquanto que no DPN35 os grupos PRL e BR diminuíram, em Stat3 aumento nos grupos BR no DPN21 e 35, enquanto que Stat5 não houve diferença nos diferentes grupos. A expressão proteica de PRL aumentou no PRL21, no DPN35 diminuiu em PRL e BR, o PRLR não teve diferença entre os grupos experimentais. A quantificação proteica de STAT3 aumento nos grupos PRL e BR em ambas as idades, no STAT5 AB e prostateína aumentou nos grupos PRL em relação aos outros dois grupos no DPN35. A expressão proteica de CK18 aumentou nos grupos tratados com BR no DPN21 e 35, em NKX3.1 o aumento no PRL em relação aos outro grupo no DPN21. Nossos resultados demonstram que a modulação de PRL interfere com a morfofisiologia prostática, aumentando a resposta proliferativa e atividade secretora, em especial nos animais tratados por período prolongado. Estes dados revelam o importante papel da PRL sobre o desenvolvimento prostático.

ABSTRACT

The prostate gland is an accessory gland of the male genital system and, in addition to androgenic dependence for its development and homeostasis, is influenced by non-steroidal hormones, among them the prolactin (PRL). Studies in animal models have shown that PRL can act with an anabolic effect on the prostate gland. Thus, our objective was to investigate the effects of PRL modulation on the development and maturation of the ventral prostate (VP) of rats. Male Sprague Dawley rats (PND 90) were divided in 6 groups (n= 6): Control group (CT) that received saline solution; Prolactin group (PRL) that received Prolactin (0.3mg/kg); Bromocriptina group (BR) that received PRL inhibitor (0.4mg/kg). All animals were submitted daily (subcutaneously) from postnatal day 12 (PND12) to PND 21 or 35. The animals were anesthetized, weighed and euthanized. Blood and VP lobes were collected, weighed and processed for morphological analyzes, western blot (WB) and RT qPCR. Treatment with PRL induced body weight gain in PND35 compared to the other groups. Histologically, there was an increase in the luminal compartment and a decrease in the epithelial compartment in the PRL and BR groups compared with CT on PND35. The immunohistochemical reaction for Ki67 demonstrated proliferation of proliferative cells in the groups treated with PRL on PND35. The PCNA quantification confirmed these data, with a significant increase in the PRL35 group. The intensity of reaction for AR was higher in the PRL35 group. Quantification of AR by WB confirmed these data. The gene expression of the PRLR increased in the PND21, whereas on PND35 the PRL and BR groups decreased, in Stat3 increased in the BR groups on PND21 and 35, whereas in the Stat5 groups there was no difference in the different groups. Protein expression of PRL increased in PRL21, on PND35 decreased in PRL and BR, PRLR had no difference between the experimental groups. The protein quantification of STAT3 increased in the PRL and BR groups in both ages, STAT5 AB and prostatein increased in the PRL groups compared with other two groups on PND35. Protein expression of CK18 increased in the groups treated with BR on PND21 and 35, on NKX3.1 the increase in PRL compared to other groups on PND21. Our results demonstrate that PRL modulation interferes with prostate morphophysiology, increasing the proliferative response and secretory activity, especially in animals treated for a long period. These data reveal the relevant role of PRL in prostate development.

1- INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento Prostático

A próstata é uma glândula exócrina acessória do sistema genital masculino, cujo desenvolvimento e homeostasia encontram-se sob controle androgênico (CUNHA et al., 1985). Ela secreta um complexo proteolítico composto por fosfatase ácida, ácido cítrico, fibrinolizina, enzimas específicas e outros fatores componentes do fluido seminal (MARKER et al., 2003). Esta secreção é fundamental para o sucesso reprodutivo, pois liquefaz o ejaculado além de possuir enzimas e gradientes iônicos que alcalinizam o canal vaginal e nutrientes que garantem a motilidade dos espermatozoides (AUMÜLLER; SEITZ, 1990).

Em homens, é a maior glândula sexual acessória e está situado inferior a bexiga urinária, envolvendo completamente a uretra (BURDEN et al., 2006) (Figura 1A). Macroscopicamente, podemos distinguir três zonas: zona central (equivalente a 5% do tecido prostático), zona de transição, compreendendo cerca de 25% do tecido prostático, e a zona periférica, que corresponde a 70% do volume da glândula e é a principal zona de ocorrência de câncer (Figura 1) (BURDEN et al., 2006).

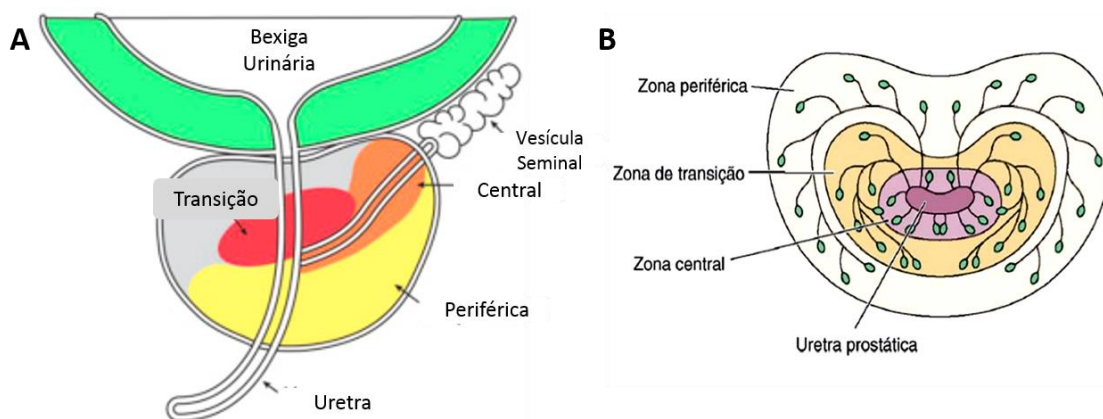


Figura 1. A- Localização e organização anatômica da próstata humana, mostrando sua divisão em três zonas, dispostas ao redor da uretra prostática (PENG; JOYNER, 2015) . B- Próstata humana é uma glândula compacta, que pode ser dividida em 3 zonas: central, transição e zonas periféricas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Em ratos e camundongos a glândula é composta por quatro lobos distintos: anterior ou glândula coaguladora, dorsal, lateral e ventral (Figura 2) (MARKER et al., 2003; SHIRAI et al., 2000). Os lobos dispõem-se ao redor da bexiga urinária, contendo particularidades quanto à ramificação de ductos e produção de secreções proteicas (SUGIMURA; CUNHA; DONJACOUR, 1986). Estudos comparativos do desenvolvimento da próstata em roedores e

humanos demonstraram que a morfogênese ocorre de maneira análoga em ambos os modelos (TIMMS; MOHS; DIDIO, 1994). Os componentes glandulares apresentam características comuns nos diferentes animais, independente do aspecto macroscópico da glândula. Os tipos de populações celulares são similares e, provavelmente, desempenham as mesmas funções, variando somente na distribuição relativa entre as espécies (IMAMOV et al., 2004). Portanto, este fator favorece estudos referentes à homologia morfofuncional entre as diferentes espécies (IMAMOV et al., 2004; KARR et al., 1995; PRICE, 1963).

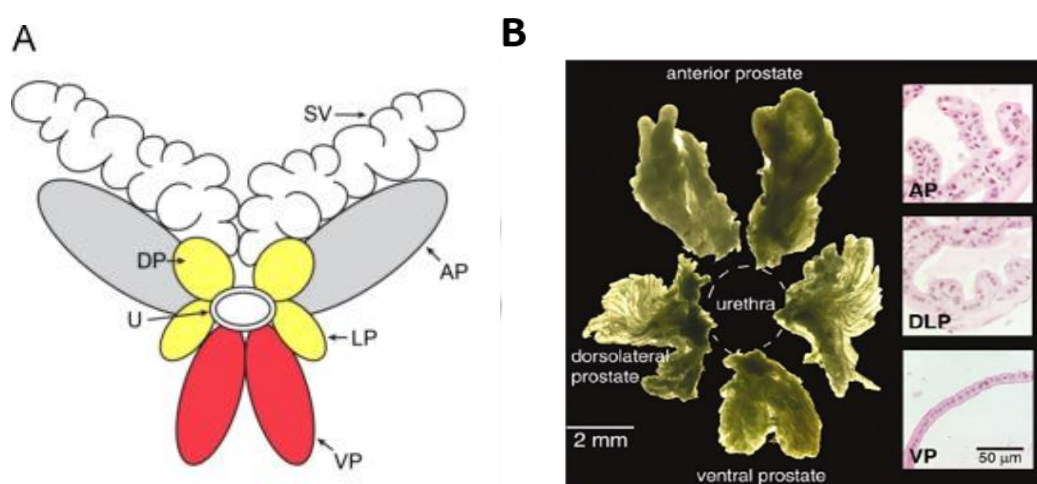


Figura 2- A- Vista anterolateral (lado esquerdo) dos lobos da próstata em relação à bexiga urinária, vesículas seminais e uretra, evidenciando os quatro lobos dispostos ao redor da bexiga urinária. **B-** Aparência macroscópica e organização microscópica (Coloração hematoxilina -eosina H.E.) dos pares de lobos prostáticos do rato adulto (B). (Adaptado de Marker et al., 2003). AP- próstata anterior; DLP- próstata dorsolateral; VP- próstata ventral.

O desenvolvimento prostático (pré e/ou pós-natal) em roedores tem sido extensivamente utilizado com o objetivo de avaliar os mecanismos moleculares e cascatas de sinalização ativados/inibidos durante a morfogênese glandular (CUNHA et al., 1987). O início do desenvolvimento prostático se dá por volta do 17º dia de gestação em camundongos, 18º dia em ratos e entre a 9-10ª semana em humanos (WELSH et al., 2008). Em todas as espécies, inclusive nos humanos, a próstata se desenvolve por meio de um processo altamente conservado, denominado “morfogênese de ramificação”, onde pequenos brotos se projetam a partir do epitélio do seio urogenital (UGS). Enquanto em humanos a maior parte do desenvolvimento da próstata ocorre no período intrauterino, nos roedores a próstata é rudimentar ao nascimento, sendo a maior parte do desenvolvimento, durante os primeiros 15 dias de vida pós-natal (DPN) (TIMMS; MOHS; DIDIO, 1994). Em ambos, esse processo se estende até que a maturidade sexual seja atingida com a puberdade (MARKER et al., 2003)

(Figura 3). Os eventos de proliferação e diferenciação celulares são complexos e regulados pela interação parácrina entre o epitélio e o estroma, modulada pela expressão de genes em uma sequência espacial e temporal precisamente coordenada, a qual são moduladas por fatores androgênicos (HUANG et al., 2009).

Durante o desenvolvimento embrionário, os andrógenos atuam via receptor, o Receptor de Andrógenos (AR), no mesênquima urogenital para induzir a proliferação epitelial, a formação de ductos e a diferenciação das células epiteliais que ocorrem em paralelo ao desenvolvimento do estroma (CUNHA et al., 1992; MARKER et al., 2003). A testosterona, um dos principais andrógenos, é produzida por células intersticiais do túbulo seminífero. Na próstata, a testosterona livre, é convertida em diidrotestosterona (DHT), pela 5 α -redutase do tipo II, mais específica para células epiteliais da próstata. E tanto a testosterona, quanto a DHT podem se ligar ao AR e migrar para o núcleo das células epiteliais (TAPLIN; HO, 2001).

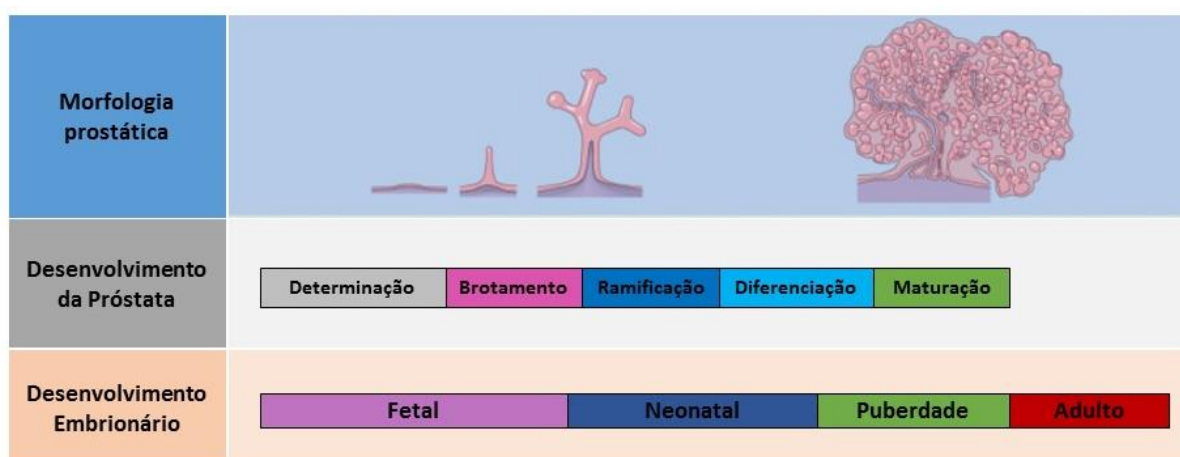


Figura 3. Estágios do desenvolvimento da próstata do rato (adaptado de PRINS; PUTZ, 2008).

A morfogênese prostática é dependente da exposição a andrógenos que são produzidos pelos testículos fetais (CUNHA et al., 1987). Em resposta aos andrógenos, o epitélio do seio urogenital passa a expressar Sonic hedgehog (Shh), que por sua vez estimula expressão do gene homeobox Nkx3.1 no DG15.5, dois dias antes de surgirem os primeiros brotos prostáticos (WILHELM; KOOPMAN, 2006). Depois do nascimento, ocorre alongamento dos brotos e início da morfogênese com a formação dos ductos (PRINS, 1992). O padrão de ramificação é complexo e lóbulo-específico, sendo que este processo se inicia na próstata ventral (PV) no DPN3-5 e dois dias depois na próstata dorsolateral (PDL). Nesse período, também ocorre início da diferenciação das células basais/*stem cells* em células basais e luminais, com expressão diferencial de citoqueratinas (CK) e receptor de andrógeno (AR), acompanhada do início da

formação do lúmen, que atinge as extremidades distais dos ductos no DPN12 (PRINS; BIRCH, 1995) (Figura 4). Concomitantemente, as células mesenquimais prostáticas condensam-se ao redor dos brotos em formação, forma-se uma camada periductal de células musculares lisas enquanto as células interductais diferenciam-se em fibroblastos (HAYWARD; ROSEN; CUNHA, 1997). Outro processo importante que ocorre entre os DPN10-15 é a diferenciação funcional das células epiteliais luminais (PRINS; BIRCH, 1995), sendo que em roedores, as proteínas de secreção prostáticas são detectáveis a partir do DPN20 e tornam-se mais abundantes concomitantemente ao aumento dos níveis séricos de testosterona.

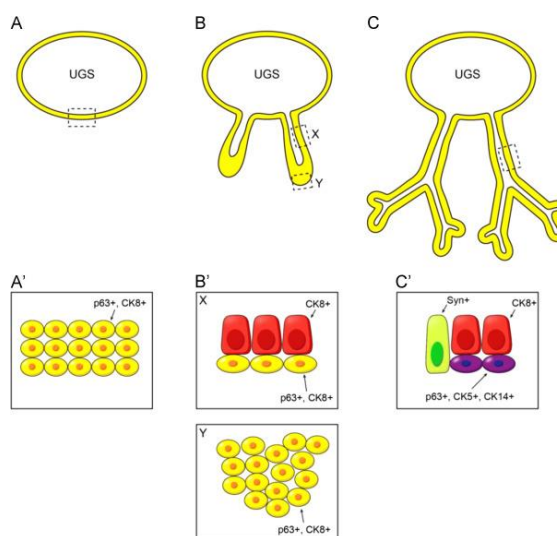


Figura 4. Diagrama ilustrando o desenvolvimento prostático e diferenciação das células epiteliais do camundongo. (A) No dia gestacional 15 (E15), o seio urogenital consiste de um epitélio pseudoestratificado e todas as células coexpressam p63 e CK8. (B) No E17, os brotos prostáticos iniciam sua formação. Na região proximal (próximo à uretra, X), as células epiteliais se distinguem em uma linhagem CK8+ revestindo o lúmen e uma linhagem p63+ CK8+ na base do epitélio. Na região distal que ainda não formou luz (Y), as células epiteliais co-expressam p63 e CK8. (C) No DPN1, e se inicia o processo de elongação e ramificação dos ductos. Sinaptofisina (Syn+) (Adaptado de PENG; JOYNER, 2015).

Além de sua importância para a fertilidade, nos últimos anos a próstata tem despertado grande interesse médico-científico pela alta incidência de doenças, principalmente a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP) (DASGUPTA; SRINIDHI; VISHWANATHA, 2012), que no Brasil, é a segunda causa de óbitos por câncer entre homens. Estimativas do Instituto Nacional do Câncer apontam para aproximadamente 62 mil novos casos diagnosticados em 2016, com número de mortes próximo de 13 mil indivíduos (<http://www.inca.gov.br>).

1.2 Prolactina

A prolactina (PRL) é um hormônio polipeptídico de aproximadamente 23kDa, pertencente à família das citocinas, sintetizado por células especializadas do lobo anterior da hipófise, os lactotrofos, sua secreção está sob regulação da dopamina ou hormônio inibidor de prolactina, produzido pelo hipotálamo e liberado na eminência média (FREEMAN et al., 2000; GRATAN; KOKAY, 2008). Sabe-se sobre a interação desse hormônio com a glândula mamária, visto que uma das suas principais funções é estimular o crescimento da glândula e induzir a lactação durante a gestação, porém a prolactina apresenta mais de 300 atividades biológicas, dentre elas, controle do desenvolvimento e funções na reprodução (BEN-JONATHAN et al., 2009; BOLE-FEYSOT et al., 1998).

O gene da PRL tem o tamanho de 10 Kb, composto por 5 éxons e 4 íntrons (COOKE et al., 1981; TRUONG et al., 1984). Duas regiões promotoras independentes são responsáveis pela transcrição do gene, a região proximal 5000 pb dirige a expressão específica de pituitária (BERWAER et al., 1993), enquanto que uma região de promotor mais distante é responsável pela expressão extrapituitária. A molécula é organizada de uma única cadeia de aminoácidos com três pontes dissulfeto intramoleculares entre seis resíduos de cisteína, em humanos consiste em 199 aminoácidos, enquanto que em ratos 197 aminoácidos (BEN-JONATHAN et al., 1996; BOLE-FEYSOT et al., 1998; WENNBO et al., 1997).

A PRL atua pela via endócrina clássica, após sua produção é secretada e transportada pelo sistema circulatório, atuando em células-alvo ou locais periféricos via receptores específicos. Estudos indicam que a atuação da PRL pode ser de forma autócrina ou parácrina (fator de crescimento, neurotransmissor ou imunomodulador), portanto, muitas das ações associada a esse hormônio podem ser ativadas, sem afetar sua concentração circulante (Figura 5) (BEN-JONATHAN et al., 2009; BOLE-FEYSOT et al., 1998; KELLY et al., 1991).

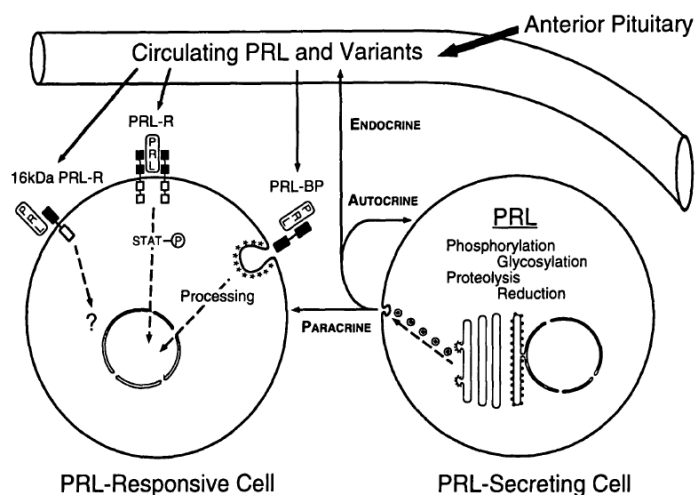
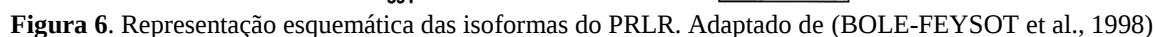


Figura 5. Diagrama mostrando as ações pleiotrópicas da PRL. A PRL circulante e as variantes são derivadas da hipófise anterior. Produzida localmente, a PRL pode afetar tanto as células adjacentes (parácrinas) ou células secretoras da própria PRL (autócrinas). O processamento da PRL pode ocorrer, tanto no local de produção e em tecidos-alvo (Adaptado de Ben-Jonathan et al. 2009)

A PRL, assim como outros hormônios, sua ação acontece na ligação a um receptor transmembrana específico, o receptor de prolactina (PRLR), pertencente à superfamília dos receptores de citocinas de classe I (BOLE-FEYSOT et al., 1998). Ao contrário da PRL, no qual um único transcrito codifica uma proteína madura, estudos apresentam em diversas espécies que o PRLR apresenta múltiplas isoformas resultantes do *splincing* alternativo do transcrito primário (ALI; PELLEGRINI; KELLY, 1991; BOUTIN et al., 1988; DAVIS; LINZER, 1989). As isoformas do PRLR diferem conforme a composição e o comprimento da cauda citoplasmática, então sendo identificadas como formas curtas (291 aminoácidos), intermediária (393 aminoácidos) ou longa (591 aminoácidos). Além dessas diferentes isoformas, outras solúveis também foram identificadas, a proteína de ligação de PRL (PRLpb), que resulta do *splincing* alternativo do mRNA ou clivagem proteolítica do PRLR ligado a membrana. Em todos os casos, o domínio extracelular de ligação ao ligante, é idêntico em todas as isoformas (Figura 6) (BOLE-FEYSOT et al., 1998; GOFFIN; KELLY, 1997; KELLY et al., 1991).



The diagram illustrates the activation of the PRL Receptor. It shows a sequence of three stages: 1. PRL (Prolactin) binding to the extracellular domain of the PRL Receptor. 2. The receptor dimerizing and activating, resulting in the formation of an active receptor complex. 3. The final active state where the receptor is fully activated and signaling.

Todas as ações atribuídas à PRL, resultam da ligação do hormônio ao seu receptor, o que conduz a ativação de uma cascata de eventos celulares. O receptor de membrana clássico, PRLR, dimeriza após ligação a PRL e ativa a via de sinalização, a principal via canônica ativada envolve a quinase de janus kinase 2 (JAK2) e o fator de transcrição STAT5 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 5), ambas as quais são ativadas por fosforilação da tirosina. A JAK2 está constantemente associada ao PRLR (LEBRUN et al., 1994). Após a fosforilação, a família de proteínas STAT, é um

importante transdutor na sinalização do receptor de citocina. A família STAT consiste em oito membros, 4 deles (STAT 1, STAT3, STAT 5a e STAT5b) foram identificados como moléculas transdutoras de PRLR. A proteína STAT acoplada ao PRLR é fosforilada pela JAK, então o dímero de STAT se transloca para o núcleo e ativa o gene alvo, iniciando diversos efeitos biológicos associados a PRL. Outras vias de sinalização podem também estar envolvidas com PRLR (Figura 8) (FREEMAN et al., 2000; GROSVENOR; MENA, 1980).

A PRL pode regular uma variedade de respostas celulares, entre elas, proliferação, diferenciação e migração. Assim, cada resposta celular depende do contexto em que o hormônio se encontra, como exemplo, pode proteger as células β -pancreáticas da apoptose (ARUMUGAM; FLEENOR; FREEMARK, 2014; TERRA et al., 2011), como pode estimular a apoptose na hipófise (FERRARIS et al., 2012, 2014)

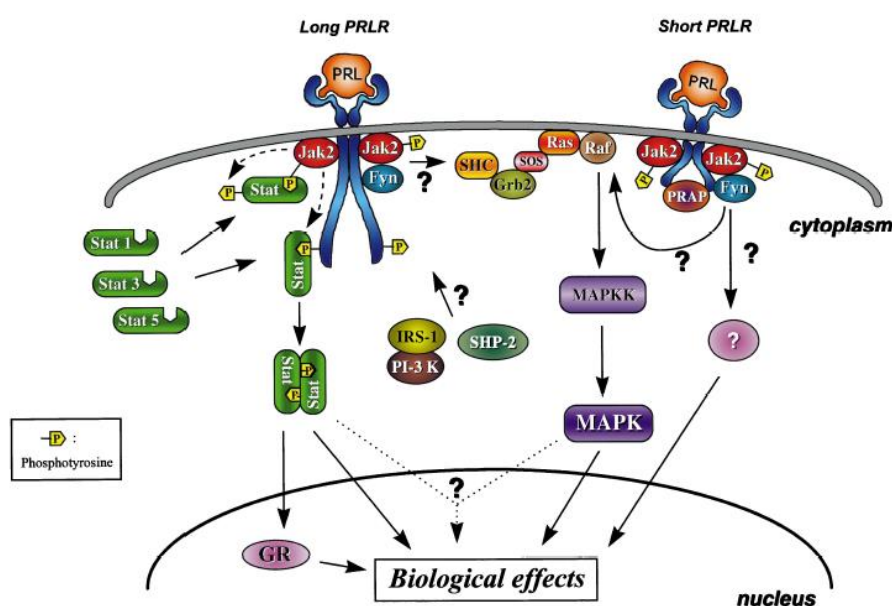


Figura 8. Representação esquemática das vias de sinalização das isoformas longa e curta do PRLR, demonstrando as diferentes vias ativadas. Adaptado de (BOLE-FEYSOT et al., 1998)

Normalmente, o alto nível de PRL pode ser denominado como hiperprolactinemia, a qual pode resultar em diversas desordens reprodutivas (GOFFIN et al., 2006). Atualmente, os agonistas da dopamina são os mais utilizados como alternativa terapêutica para a hiperprolactinemia, visto que a dopamina é o supressor fisiológico primário de produção de prolactina pela hipófise (BEVAN et al., 1992; GOFFIN et al., 2006). A bromocriptina é considerada o agonista pioneiro para o uso nos tratamentos relacionado a prolactina (Figura 9), um agonista da dopamina D2 que inibe a secreção da PRL a partir da hipófise anterior,

assim reduzindo os níveis circulantes de PRL (DORSHKIND, 2000), e é utilizado no tratamento de prolactinomas (SEEMAN; VAN TOL, 1994), para tratar a diabetes do tipo 2 (LIANG et al., 2015) e para a supressão da lactação (BERNARD et al., 2015; VERMA; SHAH; FARIDI, 2006).

Carvalho et. al, (2015) demonstraram que a inibição da prolactina com bromocriptina, durante a fase de lactação, causou na prole diversas alterações metabólicas, como desnutrição. Na idade adulta, observou-se hiperinsulinemia, aumento de glicose e triglicérides, hipotireoidismo e hipoprolactinemia (BONOMO et al., 2007). O efeito catecolaminérgicos da bromocriptina são semelhantes ao modelo de hipertensão em ratos, onde ocorre o aumento da atividade simpática regulando os receptores androgênicos e o desenvolvimento de hiperplasia prostática (GOLOMB et al., 1998; MATITYAHOU; ROSENZWEIG; GOLOMB, 2003).

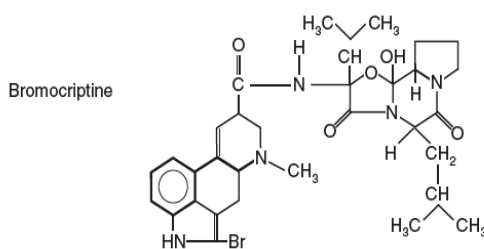


Figura 9. Imagem representativa da molécula de Bromocriptina adaptado de (HOLT; BARNETT; BAILEY, 2010).

Desde 1973 estudos demonstram a associação de altos níveis de PRL circulante com aumento do risco de tumores, assim surgiu um número crescente de estudos envolvendo a ligação entre os tumores prostáticos com excesso de produção de PRL. Em condições normais, os níveis de PRL circulantes são menores em machos que em fêmeas.

Assim, além do papel da PRL em induzir o crescimento mamário e lactação, muitos estudos têm atribuído um papel regulatório sistêmico importante para a prolactina em machos, tais como: modulação do sistema imune, manutenção das células beta na ilhota pancreática e metabolismo de lipídeos (BEN-JONATHAN et al., 2009; DORSHKIND, 2000). A super-expressão de PRL local amplia o pool de células basais/estaminais, tendo sido identificada como originador de câncer da próstata (CaP), demonstrando uma potência oncogênica da PRL no tecido da próstata (GOFFIN et al., 2011; SACKMANN-SALA; GUIDOTTI; GOFFIN, 2015). Por isso, nos últimos anos tem aumentado o número de estudos para decifrar os mecanismos celulares e moleculares pelas quais a PRL e PRLR participam na tumorigênese prostática.

1.3 Prolactina e Próstata

De acordo com Cunha et al., estrógenos atuam em sinergia com a testosterona, influenciando não apenas as funções normais da próstata, como as funções associadas a patogênese (CUNHA; HAYWARD; WANG, 2002). Além dos esteróides, outros hormônios não-esteroidais também tem sido caracterizado por atuarem no desenvolvimento e fisiologia prostática, dentre eles a PRL. A resposta prostática à PRL foi primeiramente observada por Flores et al., em próstatas de ratos hipofisectomizados e castrados, submetidos ao tratamento com extrato de hipófise (FLORES; SEGALOFF; STEELMAN, 1956). Posteriormente, vários estudos utilizando modelos animais atribuíram um papel relevante da PRL sobre o desenvolvimento normal, crescimento e função prostática (CARON; JAHN; DEIS, 1994). Este fato ganhou maior importância quando Nevalainen et al., demonstraram que a glândula prostática expressa tanto o transcrito para PRL, como seu receptor. Assim, se postulou que a PRL pode atuar como um fator de crescimento produzido localmente e que atua de forma autócrina ou parácrina, vias que divergem do conceito canônico de sinalização, onde a PRL é produzida pela hipófise e atua sobre alvos distantes do seu local de síntese (NEVALAINEN et al., 1997a).

Em ratos, os níveis de PRL em machos são baixos antes do DPN15, o aumento inicia entre DPN15 e 20, sendo o pico no DPN25. Após o pico de PRL, os níveis diminuem ligeiramente e se tornam constantes entre DPN 30 e 50 (NEGRO-VILAR; OJEDA; MCCANN, 1973). Estudos em seres humanos demonstram a influência dos níveis circulantes de PRL durante a maturação sexual (BARTKE A, KLEMCKE H, 1986). Negro- Vilar et. al, demonstraram um aumento dos níveis de PRL com o início do pico de crescimento para próstata, além disso, os níveis de estradiol em ratos machos são altos ao nascimento, caem logo após o nascimento, tendo o aumento a partir do DPN12 a 19, após esse período, os níveis diminuem imediatamente e estabilizam para a idade adulta (DÖHLER KD, 1975).

Estudos recentes têm buscado estabelecer qual o compartimento tecidual ou tipo celular seria alvo do efeito anabólico da PRL sobre o desenvolvimento da próstata. Sackmann-Sala et al., através de células basais/*stem cells* extraídas de camundongos adultos transgênicos e postas para crescer em cultura (onde as células epiteliais super- expressavam prolactina), demonstraram que o aumento intraprostático da expressão de PRL induziu amplificação dessas células no compartimento basal do epitélio glandular destes animais. Entretanto, estes autores concluíram que as células basais/*stem cells* não são ativadas diretamente da PRL e sugeriram que possa ocorrer uma via de ativação parácrina, onde as células luminais ou as células estromais

responderiam à estimulação pela PRL e produziriam fatores parácrinos que atuariam nas células do compartimento basal (SACKMANN-SALA; GUIDOTTI; GOFFIN, 2015). Para além do efeito sobre as células basais e luminais, a PRL está associada à secreção epitelial, metabolismo energético, e produção de citrato (COSTELLO; FRANKLIN, 1994), culturas de órgãos de explantes de tecido humano ou roedores evidenciaram um papel proliferativo e anti-apoptótico desse hormônio no epitélio da próstata (AHONEN et al., 1999; NEVALAINEN et al., 1997b).

Outros estudos, relacionam o sinergismo da PRL com o receptor de andrógenos, principal andrógeno envolvido no desenvolvimento e homeostasia da glândula, assim, esse sinergismo pode induzir a diferenciação e proliferação da próstata de ratos e humanos, também foi proposto, que a PRL pode aumentar as concentrações de esteróides livres no sangue, bem como a absorção de testosterona (T) em células da próstata (PRINS, 1987; SACKMANN-SALA et al., 2014a; STOKER et al., 1999). Portanto, estudos em modelos animais sugerem a participação da PRL no desenvolvimento normal, crescimento e funções da glândula prostática, a descoberta que a próstata humana expressa PRLR, indicam que esta glândula pode ser um alvo direto deste hormônio (NEVALAINEN et al., 1997a).

Atualmente, diversas funções relacionadas ao eixo PRL/PRLR são responsáveis pela coordenação da homeostase de todo o corpo, tanto em estados fisiológicos normais ou respostas adaptativas (DORSHKIND; HORSEMAN, 2000; FERRARIS et al., 2013; TOVAR; DIÉGUEZ, 2014). Embora trabalhos relacionem a expressão da prolactina com o potencial agressivo e metastático do câncer de próstata, pouco se sabe sobre o papel deste hormônio durante o desenvolvimento, em especial durante o processo de proliferação e diferenciação das células basais/*stem cells*, eventos importantes para a morfogênese normal e manutenção da homeostasia tecidual na idade adulta (PRINS; PUTZ, 2008).