

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/02/2018.

**Relativa influência da prolactina, sua inibição e combinação com
testosterona sobre a próstata de ratos castrados: Comparação
entre recrescimento glandular, diferenciação celular e atividade
secretora.**

FLÁVIA BESSI CONSTANTINO

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

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**Relativa influência da prolactina, sua inibição e combinação com
testosterona sobre a próstata de ratos castrados: Comparação
entre recrescimento glandular, diferenciação celular e atividade
secretora.**

FLÁVIA BESSI CONSTANTINO

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

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

Constantino, Flavia Bessi.

Relativa influência da prolactina, sua inibição e combinação com testosterona sobre a próstata de ratos castrados : comparação entre recrescimento glandular, diferenciação celular e atividade secretora / Flavia Bessi Constantino. - 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. Castração. 3. Prolactina. 4. Próstata. 5. Testosterona.

Palavras-chave: Bromocriptina; Castração; Prolactina; Prostata; Testosterona.

Botucatu, 22 de fevereiro de 2017

BANCA EXAMINADORA

Dr. Luis Antonio Justulin Junior (Orientador)

Assinatura

Dra. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro

Assinatura

Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior

Assinatura

Dra. Arianne Leite Rozza

Assinatura

Dra. Silvana G Pegorin de Campos

Assinatura

A minha Família e Amigos...

Dedico

Agradecimentos

Ao **Dr. Luis Antonio Justulin Junior**, pelo conhecimento compartilhado, pela ajuda nos momentos de dificuldade, paciência, compreensão. Não apenas pela relação orientador-aluno, também pela amizade durante essa caminhada. Obrigada por me receber de braços abertos no laboratório e me mostrar que trabalhar também pode ser divertido.

Ao **Laboratório de Matriz Extracelular** (Labmec) e **agregados**, por toda força e apoio tanto no laboratório como na vida pessoal, pelas muitas risadas dadas tornando os dias corridos do mestrado mais felizes, tornando as frustrações em risadas. Pelo companheirismo, por toda ajuda fornecida e pela torcida. Pelo carinho, amizade, lealdade... e principalmente pelo aprendizado. Um agradecimento em especial a **Ana Carolina Lima Camargo** (galah), por estar sempre comigo, por ser minha parceira no mestrado, por me puxar sempre “para cima” quando eu desanimava.

A **D. Tera**, pelo café, chá, bolinho de chuva, pipoca, pão, canjica, arroz doce... coisas que tornaram o trabalho mais fácil, também pelo carinho e atenção.

A **Luciana Cristina Montes Galendi**, por sempre nos ajudar com as documentações, solucionando nossos problemas sempre que precisávamos de forma rápida e efetiva.

A **Equipe de Natação da Unesp de Botucatu**, pelo apoio, força e por proporcionar momentos onde eu me desligava um pouco dos problemas da pós-graduação. Mas principalmente pelos anos de amizade, sempre me levantando quando eu pensava em desistir, sempre me fazendo querer mais e mais e ajudando a buscar meus sonhos. Um agradecimento especial ao Técnico **Miguel Antunes**, por além de técnico estar sempre preocupado com meu desempenho acadêmico me dando vários conselhos e ser um grande amigo.

A minha segunda família **Republica Labirinto**, por me aturar nos momentos de estresse, por me animarem quando chegava em casa cansada, por me trazerem alegria. Por entenderem que eu não tinha tanto tempo para passar com elas e mesmo assim estarem sempre ali quando eu precisei.

A minha **Família**, por todo amor, compreensão, carinho, cumplicidade... por serem meu porto seguro, por me apoiarem e sempre me incentivarem, pela tranquilidade que me passam de que tudo vai ficar bem, por mesmo distantes por longos tempos de casa,

sempre me liguem perguntando quando eu volto porque estão com saudades. Por me fazerem querer voar sempre mais alto, por me mostrarem que o mundo pode ser maior, mas mesmo assim sempre sentir vontade de voltar para o abraço de vocês. Obrigada por tudo, pois sem vocês eu jamais teria chegado onde cheguei.

E a todos que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento e para a confecção desta dissertação.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão
uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe
faltasse uma gota. ” (Mãre Teresa de Calcuta)*

SUMÁRIO

RESUMO	11
Capítulo 1.	12
INTRODUÇÃO	12
1.1- PRÓSTATA	12
1.2 – TESTOSTERONA, DESENVOLVIMENTO PROSTÁTICO E CASTRAÇÃO	15
1.3 PROLACTINA	18
REFERÊNCIAS	22
Capítulo 2	23
Manuscript	23
Manuscrito a ser encaminhado pra a revista <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i>	23
Abstract	24
1. INTRODUCTION	25
2. MATERIALS AND METHODS	26
2.1 Animals and treatments	26
2.2 Quantification of Serum Prolactin	27
2.3 Histological Procedure	28
2.4 Morphological, Morphometric and Stereological Analysis	28
2.5 Immunohistochemistry	28
2.6 Determination of Ki-67 index	29
2.7 Protein Extractions and Western Blotting	29
2.8 Statistical analysis	30
3. RESULTS	30
3.1 Biometric Parameters	30

3.2 Morphological and Stereological Analysis of the VP	30
3.3 Serum Prolactin Measurement.....	31
3.4 Immunohistochemistry	31
3.5 Western Blot.....	31
4. DISCUSSION.....	32
5. CONCLUSION	37
REFERÊNCIAS	38
Artigos publicados durante o mestrado:	57

RESUMO

A próstata é uma glândula do sistema genital masculino que possui grande importância na fertilidade. Estudos clássicos evidenciaram que para que se inicie o desenvolvimento prostático é necessário a presença de andrógeno produzido pelos testículos fetais. Porém, além da estimulação androgênica, estudos apontam para outros hormônios que também atuam na próstata como a Prolactina (PRL). PRL é um hormônio que é principalmente secretado por células lactotróficas da hipófise anterior e está envolvido em muitos processos biológicos, incluindo lactação e reprodução. Assim, investigamos se a modulação da sinalização PRL altera a morfofisiologia da próstata ventral (VP) em ratos castrados. Os ratos Sprague Dawley adultos ($n = 6$) foram castrados e após 21 dias divididos em 10 grupos experimentais: Castrado Controle (CC): animais castrados que não receberam tratamento; Castrado+testosterona (T): animais castrados que receberam T (4mg / kg); Castrado+PRL (PRL): animais castrados recebendo PRL (0,3 mg / kg); Castrado+T+PRL (TPRL): animais castrados que receberam associação de T e PRL; e Castrado+BR (BR): animais castrados que receberam Bromocriptina (BR) (0,4mg / kg). Grupo Controle: animais intactos (CTR). Os animais foram tratados durante 3 ou 10 dias consecutivos. Ao fim dos tratamentos, os animais foram anestesiados, eutanizados e a próstata ventral (VP) foi removida, pesada e processada para análise histológica e Western blot. O peso corporal não se alterou entre os grupos experimentais. A atrofia glandular foi induzida pela castração e a administração de andrógenos induziram o recrescimento. Não houve diferença entre o peso da VP dos grupos T e TPRL em ambas as idades. PRL ou BR não tiveram efeito sobre o peso glandular. A castração levou a uma diminuição na proliferação celular, na expressão de AR, STAT3 e 5, enquanto T ou TPRL induziram resposta proliferativa, maior expressão de AR, STAT3 e 5. O tratamento com BR durante o dia 3 ou PRL durante 10 dias aumentou STAT3. O tratamento com PRL e BR não alterou a proliferação celular ou a expressão de AR, mas aumentou a expressão da proteína do receptor de PRL (PRLR). A administração de T e TPRL não alterou este parâmetro. A prostateína diminuiu em todos os grupos tratados durante 3 e 10 dias, excepto nos animais dos grupos T10 ou TPRL10. Embora observássemos a ativação da sinalização de PRL, esta não exerceu efeito anabólico na VP de ratos castrados. A administração de PRL a 0,3 mg/kg administrada durante 3 ou 10 dias consecutivos não foi suficiente para superar a deficiência de andrógeno na próstata. Da mesma forma, não há involução glandular adicional no grupo castrado BR. Conclui-se que, apesar de estimular a via de sinalização a jusante, a PRL não atua sobre VP na ausência ou na presença de níveis supra-fisiológicos de testosterona.

Capítulo 1.

INTRODUÇÃO

1.1- PRÓSTATA

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, fibrinolisinase, enzimas específicas entre outros componentes do fluido seminal (MARKER et al., 2003). Esta secreção é fundamental para o sucesso reprodutivo, pois liquefaz o ejaculado, além de possuir enzimas, nutrientes e gradientes iônicos que alcalinizam o canal vaginal e garantem a motilidade dos espermatozoides (AUMÜLLER; SEITZ, 1990).

No homem adulto, a próstata localiza-se no compartimento subperitoneal, anterior ao reto e inferior à bexiga (SCHAUER; ROWLEY, 2011). Estruturalmente a próstata humana é encapsulada por uma fina camada de tecido fibroelástico que lhe confere uma aparência não lobulada. Contudo estudos mostram que ela possui três zonas morfológicamente distintas: (1) zona periférica (região com maior acometimento de câncer), (2) zona de transição e (3) zona central (Figura 1A) (LOWSLEY, 1912).

Já a próstata de roedores é formada por quatro lobos: lobo anterior (AP), lobo ventral (VP), lobo dorsal e lobo lateral, sendo os dois últimos também chamados de lobo dorsolateral (PDL) (Figura 1B). Cada um desses lobos apresenta características histológicas distintas como: extensas pregas epiteliais na AP, dobras menores na DLP e pregas mínimas na VP (CUNHA et al., 1987). Cada lobo é localizado em posições específicas em torno da uretra (LOWSLEY, 1912) (Figura 2A).

Em termos de homologia com a próstata humana, o lobo anterior é homólogo à zona central da glândula, enquanto que o lobo dorsolateral é considerado homólogo à zona periférica da glândula da próstata humana. O lobo ventral dos roedores, apesar de não apresentarem homologia com nenhuma zona da próstata humana, é o mais estudado, principalmente por ser o lobo de rápido e fácil acesso durante a coleta, além de ser o lobo maior e por geralmente não desenvolver prostatite, já que este não é o foco do trabalho (ROY-BURMAN et al., 2004).

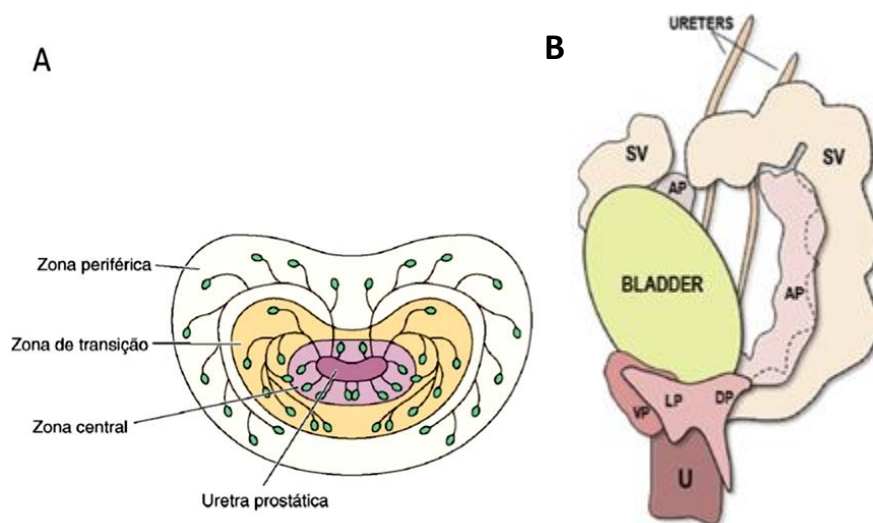


Figura 1. Organização anatômica da próstata humana (A) e da próstata de roedores (B). SV: vesícula seminal; AP: Próstata anterior; VP: Próstata ventral; LP: Próstata Lateral; DP: Próstata dorsal; U: Uretra Adaptado (JUNQUEIRA L. C.; CARNEIRO J., 2013) e (OLIVEIRA et al., 2016)

A VP é constituída de dois lóbulos (direito e esquerdo) que tem sua origem a partir da uretra formando uma estrutura tubular não ramificada, após o seu completo desenvolvimento é possível observar diferentes regiões dos ductos, dos segmentos proximal, intermediário e distal, de acordo com a sua posição em relação à uretra (LEE et al., 1990; SHABSIGH et al., 1999). Enquanto na região distal e intermediária, as células epiteliais são colunares altas, na região proximal, estas células são cúbicas e baixas. Células em proliferação são mais frequentes no epitélio da região distal, células apoptóticas são mais abundantes na região proximal e células secretoras são mais diferenciadas na região intermediária (NEMETH; LEE, 1996). Em relação ao estroma, tanto na região intermediária como na proximal, o tecido fibroso está presente no espaço entre os ductos, ocasionalmente intercalando-se com a camada de células musculares lisas que é contínua na região intermediária e torna-se descontínua na região distal (LEE et al., 1990). Independentemente da região prostática, todo o estroma é rico em elementos da matriz extracelular (MEC)(AUGUSTO; FELISBINO; CARVALHO, 2008).

A próstata apresenta uma complexa rede de ductos que se organizam de forma a dar a característica histológica de glândula túbulo alveolar composta, o seu epitélio usualmente é colunar alto, porém pode haver alteração dependendo do estado funcional da glândula. (DERMER, 1978; ICHIHARA et al., 1985). Ela possui diferentes tipos celulares que desempenham papéis importantes e específicos para a viabilidade do tecido e podem ser dependentes de andrógeno ou não (JUNG-TESTAS et al., 1981) Essas células se distribuem pela próstata de maneira semelhante entre o homem e o rato. Em ambas as espécies, o lúmen

é revestido por células epiteliais secretoras, que possuem polaridade apical-basal e são responsáveis pela síntese e secreção de proteínas e fluidos para o lúmen prostático. Uma diferença da próstata entre humanos e roedores, é que em humanos, as células epiteliais basais formam uma camada contínua, enquanto que nos ratos as células estão distribuídas de maneira descontínua. Além das células epiteliais basais e luminais, também são encontradas células neuroendócrinas, porém são células raras, existindo poucos estudos a respeito, assim são escassas as informações sobre essas células (MARKER et al., 2003) (Figura 2B).

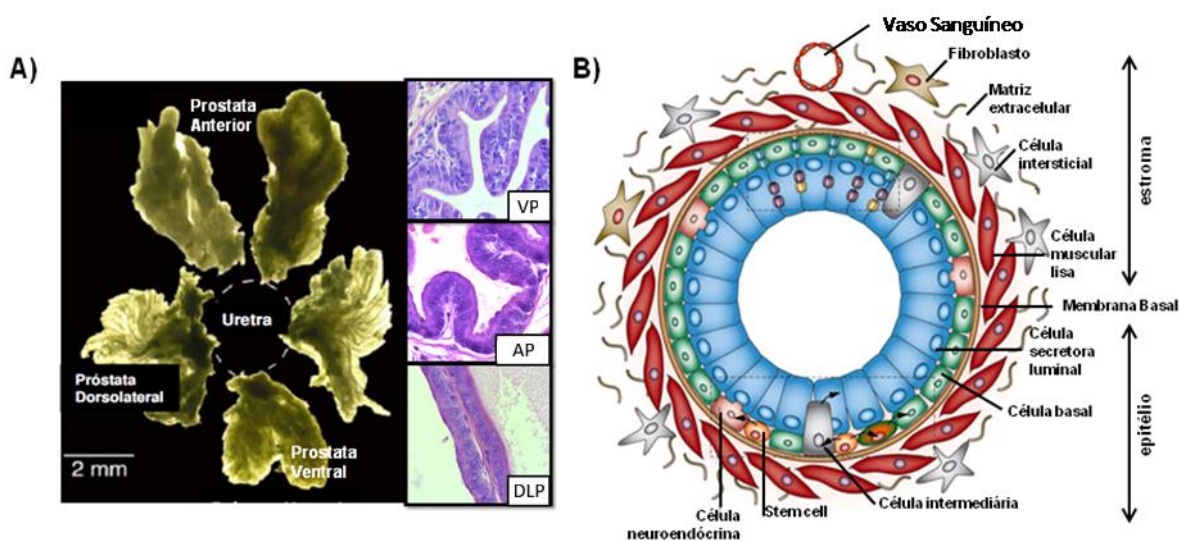


Figura 2. Imagem dos lobos prostáticos e sua organização celular. A) Aparência macroscópica e organização microscópica (coloração em H.E.) dos pares de lobos prostáticos de camundongo- modificado de (MARKER et al., 2003). B) Esquema da organização celular do epitélio e estroma prostático do homem adulto - modificado de (CZYŻ; SZPAK; MADEJA, 2012). PA, próstata anterior; PDL, próstata dorsolateral; VP, próstata ventral.

O componente estromal engloba todos os elementos celulares e extracelulares que estão fora da lâmina basal epitelial como a camada fibromuscular que cerca a glândula. Além da camada muscular, o estroma também apresenta fibroblastos, vasos sanguíneos e os pericitos associados, células imunitárias, terminações nervosas e vasos linfáticos, os quais são incorporados em uma matriz extracelular colagenosa. (AUMÜLLER, 1983).

Além de sua importância para a fertilidade, nos últimos anos a próstata tem despertado grande interesse médico-científico pela alta incidência de distúrbios, principalmente a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (PCa) (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 69 mil novos casos diagnosticados em 2016, com número de mortes próximo de 13 mil indivíduos (INCA, 2016).

1.2 – TESTOSTERONA, DESENVOLVIMENTO PROSTÁTICO E CASTRAÇÃO

A testosterona (T) é um hormônio lipídico sintetizado e secretado pelas células de Leydig que se localizam na região intersticial dos Tubulos seminíferos. A sua secreção é controlada através do feedback negativo no eixo hipotálamo-hipófise. A T após ser produzida pode ter ação local (parácrino) ou sistêmica (endócrina) de forma que este hormônio é liberado na corrente sanguínea e pode atuar em outros tecidos alvos. No entanto a T circula no sangue ligada a albumina e a globulina de ligação ao hormônio sexual (SHBG). Além disso dependendo do tecido alvo a T acaba não sendo o androgênio utilizado, esta é convertida em di-hidrotestosterona (DHT), processo que ocorre no citoplasma celular através da enzima 5 α -redutase, e a DHT é mais potente que a T (COSTANZO, 2014).

Portanto a T e a DHT são hormônios responsáveis pelo desenvolvimento do sistema genital masculino e pelas características sexuais secundárias.(MACLEAN et al., 1993) A ação de ambos é mediada via receptor de andrógeno (AR), um fator de transcrição nuclear dependente do ligante. (CHANG et al., 1995) Na ausência do ligante o AR é citoplasmático e está associado a proteínas heat-shock (HSPs), com a ligação dos andrógenos o AR dissocia-se das proteínas, é fosfolilado e se dimeriza. O complexo AR-Andrógeno desloca-se para o núcleo para assim modular a transcrição dos genes alvos. (DAVEY; GROSSMANN, 2016; EDER et al., 2001; FELDMAN; FELDMAN, 2001) (Figura 3)

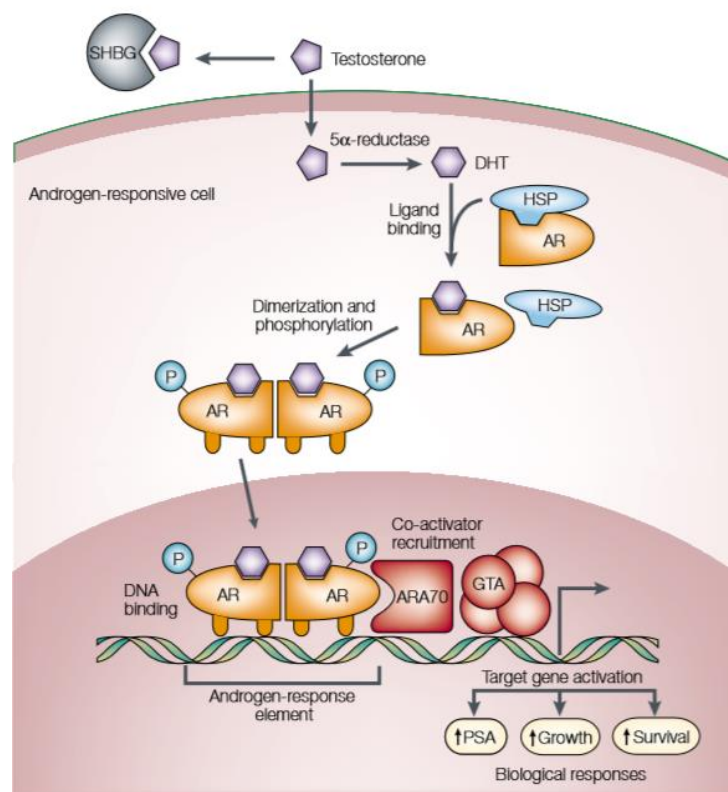


Figura 3 – Ação andrógena. A testosterona circula no sangue ligada à albumina (não mostrada) e à globulina de ligação aos hormônios sexuais (SHBG) e troca com testosterona livre. A testosterona livre entra nas células da próstata e é convertida em dihidrotestosterona (DHT) pela enzima 5α-redutase. A ligação de DHT ao receptor de androgénio (AR) induz a dissociação de proteínas de “heat-shock” (HSPs) e a fosforilação do receptor. A AR dimeriza e liga-se aos elementos de resposta androgénica nas regiões promotoras dos genes alvos. Adaptado de (FELDMAN; FELDMAN, 2001) Imagem ilustrativa.

Assim, Tanto o desenvolvimento prostático (pré e/ou pós-natal), como o recrescimento prostático induzido por T em ratos castrados tem sido extensivamente utilizado com o objetivo de avaliar os mecanismos moleculares e cascatas de sinalização durante a morfogênese e recrescimento glandular (CUNHA et al., 1987; JUSTULIN et al., 2010; PENG et al., 2013). 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).

A próstata se desenvolve em diferentes espécies 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 intra-uterino, nos roedores a próstata é rudimentar ao nascimento, sendo a maior parte do desenvolvimento, durante os primeiros 15

dias de vida pós-natal (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 4).

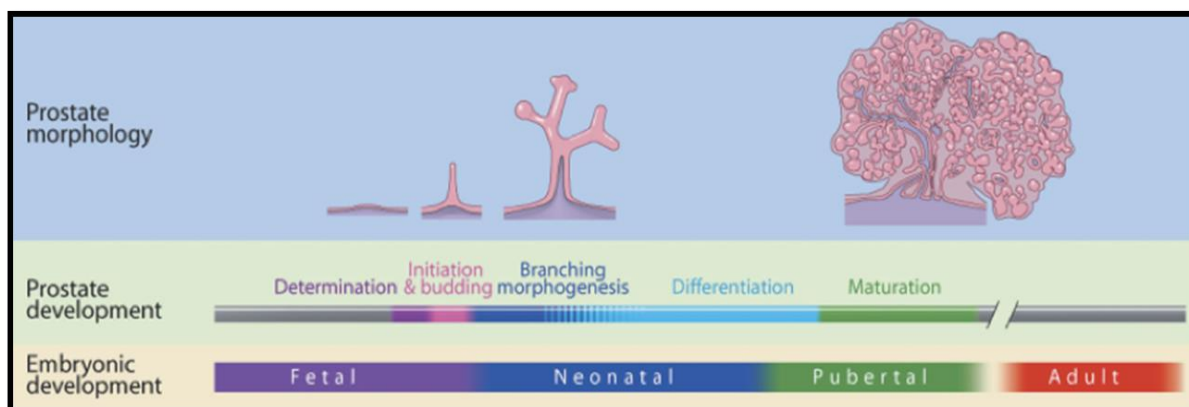


Figura 4: Estágios do desenvolvimento da próstata do rato - adaptado (PRINS; PUTZ, 2008).

Estudos clássicos evidenciaram que a presença de andrógeno produzido pelos testículos fetais é necessário para o início do desenvolvimento prostático (TAKEDA; CHANG, 1991). Particularmente no rato, a síntese de T pelos testículos fetais tem início entre os dias 13-14 da gestação (DG) (WILSON et al., 1983). Em resposta aos andrógenos, o epitélio do UGS 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 glandulares (PRINS et al., 1992).

O padrão de ramificação é complexo e lóbulo-específico, sendo que este processo se inicia na VP no dia pós-natal (DPN) 3-5 e dois dias depois na PDL. Nesse período, também ocorre início da diferenciação das célula tronco progenitora em células basais e luminais, com expressão diferencial de citoqueratinas (CK) e do receptor de andrógeno (AR), acompanhada do início da formação do lúmen, que atinge as extremidades distais dos ductos no DPN12 (PRINS; BIRCH, 1995) (Figura 2).

Estudos clássicos demonstram que a homeostasia prostática depende da manutenção de níveis fisiológicos de andrógenos (SUGIMURA; CUNHA; DONJACOUR, 1986). Neste contexto, após a castração cirúrgica (retirada dos testículos) ou química (administração de antiandrogênicos) ocorre um intenso processo de involução prostático, com eliminação de células epiteliais por apoptose, levando a uma rápida queda no conteúdo glandular de RNA, DNA e proteínas de secreção e remodelação do estroma periductal. Por outro lado, a administração de andrógeno a animais castrados estimula o recrescimento glandular, com completa recuperação após 7-10 dias de reposição hormonal (JUSTULIN et al., 2006, 2010;

SUGIMURA; CUNHA; DONJACOUR, 1986). Este ciclo de involução/recrescimento pode se repetir por várias vezes com a completa recuperação glandular (HU et al., 2011; MARKER et al., 2003; SCHRAMEK et al., 2010). Este recrescimento acontece através de ativação de processos proliferativos das células epiteliais que resistiram à condição de privação de andrógeno. (DE CARVALHO; VILAMAIOR; TABOGA, 1997; JUSTULIN et al., 2010; VILAMAIOR et al., 2000; YAMASHITA et al., 1996). Assim, estes dados sugerem a existência de uma população de células progenitoras na próstata de animais adultos, capazes de sobreviver à condição de privação androgênica e com capacidade de proliferar e se diferenciar para recompor os ductos prostáticos observados em um animal adulto normal (SHI et al., 2014).

1.3 PROLACTINA

O desenvolvimento prostático é dependente de andrógeno, porém existem outros hormônios esteroides ou não esteroides que também afetam a próstata. Estudos demonstraram que a prolactina PRL exerce importante papel tanto para o desenvolvimento como para a manutenção glandular de animais adultos (GOFFIN et al., 2005). Neste sentido, tem sido proposto que a modulação da via de sinalização da PRL poderia ser um alvo promissor para o tratamento do PCa (HASSAN et al., 2009; HERRERA-COVARRUBIAS et al., 2015). A PRL secretada de forma autócrina e/ou parácrina vem sendo sugerida para a contribuição da tumorigenese prostática. Camundongos com superexpressão de PRL na próstata desenvolvem hiperplasia, neoplasia intra-epitelial e até adenocarcinoma prostático (ROUET et al., 2010; WENNBO et al., 1997). A presença de PRL e STAT-5 fosforilado em tumores prostáticos está relacionada com o aumento da agressividade da doença (LI et al., 2004).

A PRL é um hormônio polipeptídico secretado pelas células secretoras lactotrofo da hipófise, porém estudos demonstram que este hormônio também possui fonte extra-hipofisaria, como a próstata (SACKMANN-SALA; GOFFIN, 2015). Foi descoberta aproximadamente há 90 anos atrás, conhecida como o hormônio da lactação, ela atua na fisiologia (reprodução, lactação, crescimento, metabolismo e transporte eletrolítico) e na patologia (imunidade e carcinogênese) (BEN-JONATHAN; LAPENSEE; LAPENSEE, 2008; BOLE-FEYSOT et al., 1998; GOFFIN et al., 2002) da glândula mamária (LEE et al., 2013; SCHRAMEK et al., 2010), prostática (SACKMANN-SALA; GOFFIN, 2015), além

do cérebro (LARSEN; GRATAN, 2012; SHINGO et al., 2003), da medula óssea (OGUETA et al., 2002), do folículo capilar (RAMOT et al., 2010), células hematopoiéticas (WELNIAK et al., 2000), do hipocampo (WALKER et al., 2012).

O gene da PRL é único nos mamíferos e está localizado no cromossomo número 6 em humanos, possuindo 6 exons e 4 introns, (TRUONG et al., 1984; YOSHIKI et al., 1991). Apresenta peso molecular de 23Kda, possuindo em sua forma madura 199 aminoácidos (FREEMAN et al., 2000; GREGERSON, 2006) e é caracterizado por apresentar uma estrutura 3D composto por 4 α hélices antiparalelas (HORSEMAN; YU-LEE, 1994). Embora esta forma seja a mais encontrada, existem outras isoformas da PRL, muitas resultam de alterações pós-transcricionais como glicosilação, fosforilação e sulfatação (FREEMAN et al., 2000). Assim existem hormônios maiores com peso aproximado de 100 KDa com uma atuação mínima no organismo (GIBNEY; SMITH; MCKENNA, 2005; JOSEPH MCKENNA, 2009; SULIMAN et al., 2003) e também existem PRL com peso molecular menores, com 14 KDa, 16KDa e 22KDa.

A PRL com peso molecular de 16 KDa é inicialmente uma proteína de 23KDa clivada por uma metaloproteinase ou pela catepsina D (CLAPP et al., 2006), esta clivagem pode ocorrer dentro das células ou em capilares sanguíneos. Por ela possuir apenas uma ponta N-terminal perde a habilidade de se ligar ao seu receptor (CLAPP; WEINER, 1992; MACOTELA et al., 2006), no entanto é capaz de se ligar a células endoteliais (CLAPP; WEINER, 1992) e tem propriedades anti-angiogênicas (CLAPP et al., 1993).

A ação da PRL é mediada por um receptor transmembrana membro da superfamília de citocinas hematopoiéticas, o receptor de PRL (PRLR). (SACKMANN-SALA; GUIDOTTI; GOFFIN, 2015). A conformação deste receptor é única, contendo dois domínios extracelulares, sendo um portador de duas pontes dissulfetos (essenciais para a interação com o ligante), e outro importante para o deslocamento e dobramento do receptor (GOFFIN; FERRAG; KELLY, 1998). Além dos dois domínios extracelulares, PRLR possui também um único domínio intermembranar e outro domínio intracelular que apresenta duas regiões importantes, BOX1 e BOX2, responsáveis pela transdução do sinal (KELLY et al., 1991).

Este receptor apresenta apenas um gene em todas as espécies, sendo que no humano este gene é localizado no cromossomo número 5 e em ratos no cromossomo número 15. O gene dos mamíferos apresenta 10 exons, que podem sofrer *splicing* alternativos, o que faz com que haja uma variedade de isoformas deste receptor. Estas apresentam um idêntico domínio extracelular, o que difere é o comprimento do domínio intracelular que pode ser grande, médio

ou curto (BOLE-FEYSOT et al., 1998; HU; MENG; DUFAU, 2001; KLINE; ROEHRS; CLEVENGER, 1999). Em humanos encontramos a forma longa, já em ratos temos uma forma longa e outras três formas curtas já descritas (CLARKE; LINZER, 1993; DAVIS; LINZER, 1989). A ligação com este receptor não é exclusivo da PRL, podendo se ligar também, lactogênio placentário e hormônio do crescimento, o que dificulta determinar o efeito específico da PRL (BROOKS, 2012).

A PRL possui 2 sítios de ligação, o primeiro é composto pelas α hélices 1 e 4, e o segundo pelas 2 e 3. O primeiro sítio de ligação da PRL se liga ao domínio extracelular na região dissulfeto do receptor, este é o pré-requisito para que o segundo sítio possa se ligar (GOFFIN et al., 1996). Como o RPLR apresenta apenas um sítio de ligação é necessário outro RPLR que irá fazer a ligação então com o segundo sítio de ligação da PRL (BOLE-FEYSOT et al., 1998).

Estudos mostram que a região do domínio intracelular é fosforilada bem na região do BOX1 onde fica acoplado a proteína JAK2 (Janus Kinase 2), assim duas JAK2 são fosforiladas. Com a JAK2 fosforilada membros citoplasmáticos desta via também são fosforilados como o STAT (sinal transdutor e ativador de transcrição) família que representa a canônica via JAK-STAT (Figura 5) (GOFFIN et al., 2002).

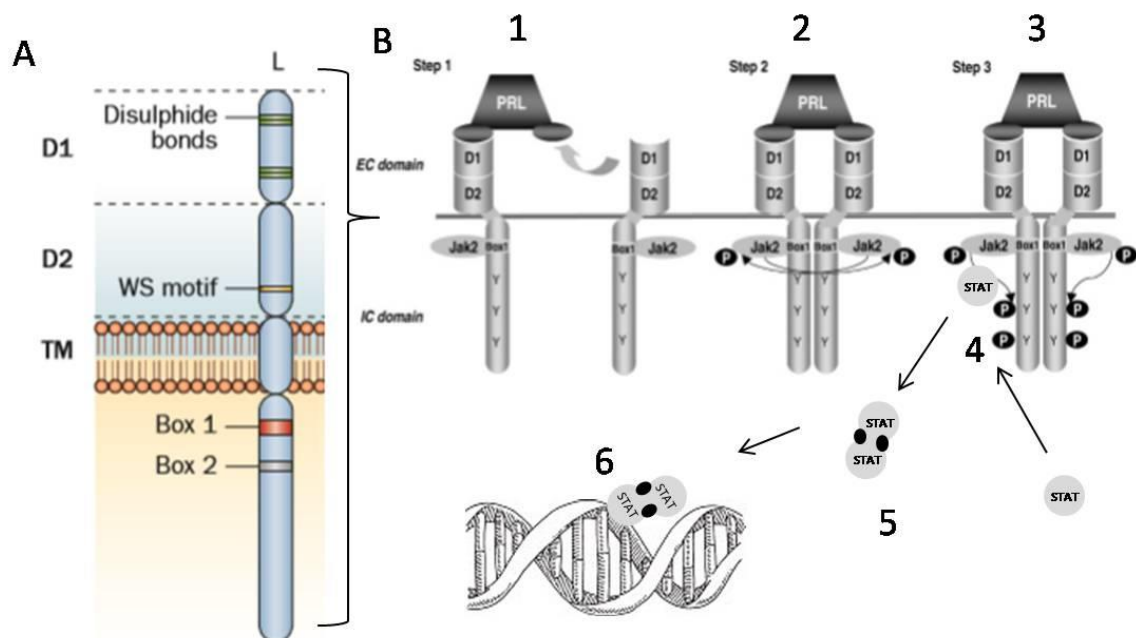


Figura 5 – A) Molécula do receptor de PRL com seus domínios. B) 1-ativação do receptor pela PRL, 2-fosforilação de JAK2, 3/4-fosforilação do STAT, 5-formação do dímero de STAT e 6- chegada desse dímero no DNA. Adaptado de (BERNARD et al., 2015; FREEMAN et al., 2000) Imagem ilustrativa.

A ativação do PRLR e da JAK2 cria um local de acoplamento para o STAT, que por sua vez é recrutado para o receptor e vem ser fosforilado com um único resíduo de tirosina no domínio SH2. STATs ativados dissociam-se do receptor e se ligam formando um dímero de STAT, (BOLE-FEYSOT et al., 1998) translocam-se para o núcleo, onde este dímero interage com o seu local de reconhecimento nos promotores de genes alvo (Figura 4) (BOLE-FEYSOT et al., 1998; CARTER-SU; SMIT, 1998).

STATs são uma família de fatores de transcrição que medeiam respostas de citocinas e fatores de crescimento (LEVY; DARNELL, 2002). Dentro da família dos STATs temos o Stat5 a/b que é um mediador primário de efeitos de PRL no epitélio da próstata; ele está presente na progressão do câncer da próstata, e a inibição desta via leva a apoptose disseminado (SACKMANN-SALA; GUIDOTTI; GOFFIN, 2015). O STAT-5 regula funções como proliferação, progressão do ciclo celular, apoptose, angiogênese e respostas do sistema imune, além de exercer efeitos nos Câncer *Stem Cells* (SIVEEN et al., 2014).

O processo de síntese de PRL é controlado por fatores estimulatórios e fatores inibitório. O efeito de inibição da PRL é mediado por receptores dopaminérgicos da subclasse D2, responsáveis por regular negativamente a produção de PRL pela hipófise, e reduzir os níveis de PRL circulantes, sendo a Bromocriptina (BR) um agonista pioneiro desse efeito (GOFFIN; TOURAINE, 2015). A próstata de rato tem receptores dopaminérgicos localizados em ambas as células estromais e epiteliais, a interação de PRL e BR em tecidos da próstata podem ser relevantes para a manutenção e função da glândula (AMENTA; CAVALLOTTI; AMENTA, 1987).

Estudos mostram que pacientes com câncer de mama e próstata apresentam seus níveis de PRL normalizados quando tratado com BR (LISSONI et al., 2000). Assim como a supressão de PRL causado através do tratamento com BR, em ratos no período de lactação, consegue provocar várias alterações metabólicas influenciando a capacidade reprodutiva desses ratos machos (CARVALHO et al., 2015).

Neste contexto, estudos que enfoquem o efeito da administração de PRL ou de sua inibição podem auxiliar no entendimento das respostas celulares em condições de privação androgênica e de reposição hormonal após a castração, melhorando o entendimento da biologia prostática.