

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Marina das Graças Carneiro e Silva

Estudo do Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF) no
Desenvolvimento do Lobo Dorsal da Próstata de Camundongos

Uberlândia - MG
Novembro de 2024

Marina das Graças Carneiro e Silva

Estudo do Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF) no
Desenvolvimento do Lobo Dorsal da Próstata de Camundongos

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a aprovação na disciplina Trabalho e Conclusão de Curso II do curso de graduação em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniele Lisboa Ribeiro

Linha de Pesquisa: Biologia da Reprodução

Uberlândia - MG
Novembro de 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Estudo do Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF) no
Desenvolvimento do Lobo Dorsal da Próstata de Camundongos

Marina das Graças Carneiro e Silva

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniele Lisboa Ribeiro
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela Coordenação do Curso de
Biotecnologia em ___/___/___

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior

Uberlândia - MG
Novembro de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Milton e Marilda, que sempre me ensinaram o valor do conhecimento e me apoiaram incondicionalmente em cada passo da minha trajetória. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui.

Ao meu irmão, Rafaell, que me incentivou e esteve ao meu lado nos momentos de dúvida, celebrando cada conquista como se fosse sua. Sua presença sempre me deu força.

À minha amiga Laura, minha companheira de laboratório, que compartilhou comigo os desafios e as alegrias desta jornada. Sua parceria foi fundamental e tornou cada dia mais leve.

Aos demais colaboradores do laboratório, em especial à Júlia e Luiz Felipe, pela dedicação em ensinar e pela sinergia em todos os projetos que realizamos juntos. Vocês tornaram nosso ambiente de trabalho ainda mais especial.

Agradeço também à minha orientadora, Daniele, a quem sou eternamente grata por ter me dado a oportunidade, desde o início da graduação, de fazer parte do Laboratório de Bioquímica. Sua orientação, apoio, ensinamentos e paciência foram essenciais para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Por fim, agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Universidade Federal de Uberlândia pelo suporte e pelas oportunidades que possibilitaram minha formação e pesquisa. A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, meu sincero obrigado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Características Gerais da Próstata	10
1.2. Histologia da Próstata	11
1.3. Resposta Androgênica	13
1.4. Desenvolvimento da Próstata	15
1.5. Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF)	18
1.6. Justificativa	21
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	22
3. METODOLOGIA	22
3.1. Animais	22
3.2. Análise morfológica	22
3.3. Análises imunocitoquímicas	23
3.4. Avaliação de apoptose	23
3.5. Quantificação de testosterona por ELISA	24
3.6. Análise estatística	24
4. RESULTADOS	24
4.1. Dados Biométricos	24
4.2. Estereologia	25
4.3. Avaliação de células proliferativas	26
4.4. Avaliação estromal	28
4.5. Quantificação de caspase-3 ativa	31
4.6. Níveis séricos de Testosterona (T)	32
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÃO	37
7. REFERÊNCIAS	37

RESUMO

A próstata é uma glândula anexa ao sistema genital masculino de mamíferos que apresenta um importante período de desenvolvimento pós-natal. A ativação de vias de sinalização referentes à proliferação e morte celular são essenciais para o desenvolvimento prostático. Por sua vez, o fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) foi identificado há quase seis décadas como uma citocina pró-inflamatória. Estudos subsequentes gradativamente elucidaram sua indispensabilidade para o desempenho de inúmeras outras funções celulares, tais como o desencadeamento de vias de sinalização, como as vias anteriormente citadas, as quais promovem a expressão de fatores anti-apoptóticos, pró-proliferativos e pró-angiogênicos. O presente estudo investigou a influência do MIF na histoarquitetura do lobo dorsal da próstata de camundongos, analisando o papel da citocina na interação epitélio-estroma da glândula, com foco no estudo de células musculares, fibroblastos e sua relação com a proliferação epitelial. Foram estudados camundongos machos C57BL/6 selvagens e MIF knockout (MIF^{-/-}) nas idades de 30 (pré-púbere) e 60 (púbere) dias. A próstata dorsal foi removida, pesada e parte fixada em metacarn (para processamento histológico, colorações e imuno-histoquímica), outra parte congelada para extração de proteínas e análise de apoptose. Os resultados mostraram que a ausência de MIF impacta significativamente o compartimento epitelial, reduzindo a proliferação celular e, conseqüentemente, a área do epitélio prostático. Além disso, o grupo MIF^{-/-} apresentou uma antecipação do desenvolvimento prostático, com resultados mais acentuados na fase pré-púbere, período em que foi observado o aumento de fibroblastos, a diminuição proliferativa epitelial, o aumento de testosterona, entre outros fatores. No entanto, constatou-se que o organismo demonstrou uma tentativa de restabelecer a homeostasia da glândula, possivelmente realizada por meio da ativação de vias secundárias de proliferação, como as vias mTOR e EGF/EGFR, uma vez que ambos possuem ação mediada de forma independente a MIF. Diante da importância do período pós-natal no desenvolvimento prostático, concluímos que o MIF tem relevância no processo de maturação da próstata, permitindo que esta atinja um arranjo tecidual adequado para o desempenho normal das funções fisiológicas e sexuais no homem. Essas descobertas ressaltam a importância do MIF na homeostase prostática e abrem caminhos para futuras pesquisas sobre sua manipulação terapêutica, uma vez que o seu bloqueio vem sendo estudado nos tratamentos do câncer de próstata.

Palavras-chave: Próstata, Câncer de Próstata, Citocina, MIF.

ABSTRACT

The prostate is a gland attached to the male genital system of mammals that undergoes an important period of postnatal development. The activation of signaling pathways related to cell proliferation and death are essential for prostate development. In turn, macrophage migration inhibitory factor (MIF) was identified almost six decades ago as a pro-inflammatory cytokine. Subsequent studies gradually elucidated its indispensability for the performance of numerous other cellular functions, such as the triggering of signaling pathways, such as the previously mentioned pathways, which promote the expression of anti-apoptotic, pro-proliferative and pro-angiogenic factors. The present study investigated the influence of MIF on the histoarchitecture of the dorsal lobe of the prostate of mice, analyzing the role of the cytokine in the epithelium-stroma interaction of the gland, focusing on the study of muscle cells, fibroblasts and their relationship with epithelial proliferation. Male C57BL/6 wild-type and MIF knockout (MIF^{-/-}) mice were studied at the ages of 30 (prepubertal) and 60 (pubertal) days. The dorsal prostate was removed, weighed and partly fixed in metacarp (for histological processing, staining and immunohistochemistry), the other part frozen for protein extraction and apoptosis analysis. The results showed that the absence of MIF significantly impacts the epithelial compartment, reducing cell proliferation and, consequently, the area of the prostatic epithelium. Furthermore, the MIF^{-/-} group presented an anticipation of prostate development, with more pronounced results in the prepubertal phase, a period in which an increase in fibroblasts, a decrease in epithelial proliferation, an increase in testosterone, among other factors, were observed. However, it was found that the organism demonstrated an attempt to reestablish the homeostasis of the gland, possibly carried out through the activation of secondary proliferation pathways, such as the mTOR and EGF/EGFR pathways, since both have action mediated independently of MIF. Given the importance of the postnatal period in prostate development, we conclude that MIF is relevant in the process of prostate maturation, allowing it to reach a tissue arrangement adequate for the normal performance of physiological and sexual functions in men. These findings highlight the importance of MIF in prostate homeostasis and open avenues for future research on its therapeutic manipulation, since its blockade has been studied in prostate cancer treatments.

Keywords: Prostate, Prostate Cancer, Cytokine, MIF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do complexo prostático de roedores (A) e próstata humana (B)	11
Figura 2 - Secção transversal ductal da próstata	12
Figura 3 - Inter-relações entre o compartimento estromal e epitelial prostático	15
Figura 4 - Morfogênese glandular pós-natal na próstata dorsolateral	17
Figura 5 - Representação esquemática do desenvolvimento da próstata durante as primeiras 12 semanas pós- natis	18
Figura 6 - Função e sinalização do MIF	19
Figura 7 - Níveis de caspase-3 ativa na próstata de camundongos com 30 e 60 dias de idade	26
Figura 8 - Níveis de testosterona sérica de camundongos com 30 e 60 dias de idade	27
Figura 9 - Coloração por Picrosirius	29
Figura 10 - Imunohistoquímica para alfa-actina	30
Figura 11 - Imunohistoquímica para vimentina	31
Figura 12 - Imunohistoquímica para pcna	32
Figura 13 - Coloração por hematoxilina e eosina	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados biométricos	25
---	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características Gerais da Próstata

A próstata é uma glândula exócrina, anexa ao sistema genital masculino de mamíferos. Sua localização se dá desde a cavidade pélvica, distal ao colo da bexiga, até a porção inicial da uretra peniana, por onde é crivada pela uretra prostática (AMIN et al., 2010). De acordo com Verze et al., (2016), a principal função da glândula está na produção e no armazenamento do líquido prostático, sendo este, correspondente a aproximadamente 30% do plasma seminal em humanos. E, associado ao líquido seminal produzido pelas vesículas seminais e aos espermatozoides produzidos nos testículos, proporcionam condições para a sobrevivência aos espermatozoides no sêmen durante seu transporte pelo sistema genital masculino e feminino, viabilizando a fertilização e a reprodução humana (BURDEN et al., 2006).

A organização da próstata humana em regiões teve início a partir de Lowsley (1912) que, ao estudar a anatomia de embriões humanos, propôs a sua divisão em cinco lóbulos: anterior, posterior, laterais e central. No entanto, atualmente, utiliza-se um novo conceito de divisão proposto por McNeal (1978), o qual divide a próstata em três grandes zonas anatômicas principais: zona periférica (ZP), zona central (ZC) e zona de transição (ZT), que se diferenciam biológica e histologicamente. Ainda, há autores que consideram uma quarta zona, a zona anterior (ZA). A zona anterior ou fibromuscular da próstata não é incluída na classificação de McNeal devido à sua composição predominantemente de tecido fibromuscular, com pouca presença de tecido glandular. Esse tipo de tecido tem menor relevância funcional e patológica em comparação com as zonas periférica, central e de transição, que são mais associadas a condições como câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna. O câncer prostático, por exemplo, afeta principalmente a zona periférica, enquanto a hiperplasia ocorre na zona de transição, tornando a zona anterior menos relevante para os estudos anatômicos e patológicos da próstata (DE MARZO, et al., 2007). Diferente dos humanos, os murinos possuem um complexo prostático composto por quatro pares de lobos de simetria bilateral, denominados de acordo com a posição em relação à uretra, sendo estes os lóbulos anterior (LA), dorsal (LB), lateral (LL) e ventral (LV) (**Figura 1**) (RISBRIDGER ; TAYLOR., 2006; LEE et al. 2011).

Dessa forma, acredita-se que os lobos de roedores possuem correspondência histofisiológica com as zonas prostáticas humanas, e, portanto, seus estudos são

equiparados. A próstata dorsal, no entanto, destaca-se por possuir homologia histopatológica e resposta androgênica correspondente à zona periférica da próstata humana. Esta zona é o principal alvo acometido por neoplasias espontâneas ou induzidas em seres humanos, e o seu estudo é de grande importância para a compreensão, tanto da biologia reprodutiva masculina, quanto da fisiologia de patologias envolvidas (IMASATO, 2001; DANIELPOUR et al., 1994).

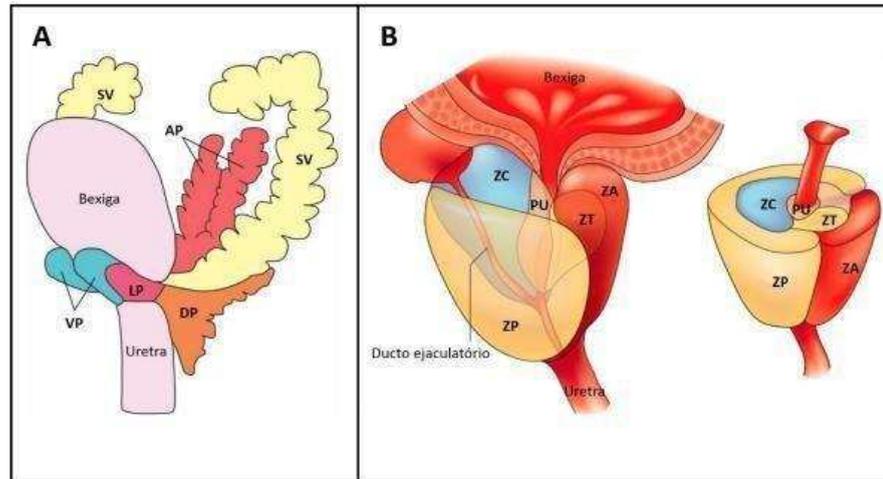


Figura 1: Representação esquemática do complexo prostático de roedores (A) e próstata humana (B). As zonas prostáticas podem estar dispostas de maneira concêntrica ao redor da uretra prostática, como ocorre em humanos, ou na forma de lobos, como observado em roedores. (A) VP: próstata ventral, LP: próstata lateral, DP: próstata dorsal, AP: próstata anterior, SV: vesícula seminal. Adaptado de (SUGIMURA, et al., 1986). (B) ZT: zona de transição, ZC: zona central, ZP: zona periférica, ZA: zona anterior ou fibromuscular, PU: região glandular periuretral. Adaptado de DE MARZO, et al., (2007).

1.2. Histologia da Próstata

Do ponto de vista histológico, a próstata é constituída por túbulos secretores e ácinos. Estes ácinos são compostos por um epitélio secretor que reveste o espaço onde a secreção é armazenada, e ficam situados em um tecido conjuntivo denso comumente chamado de estroma.

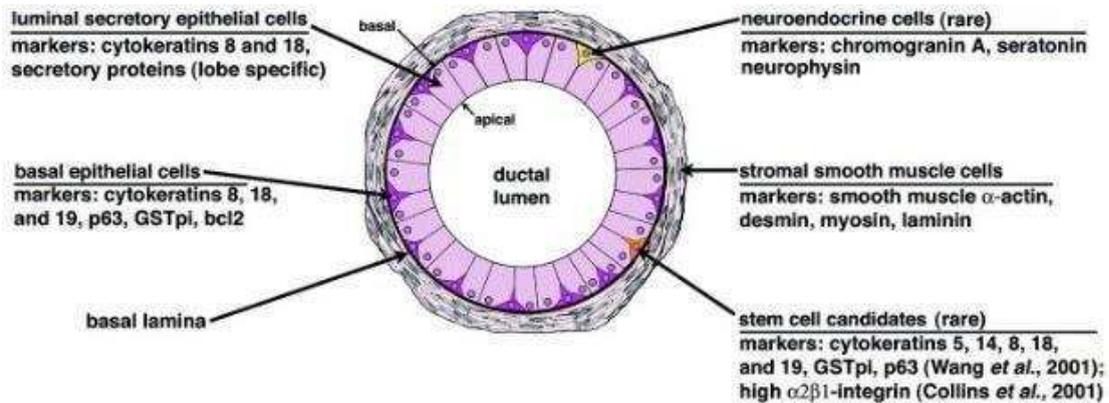


Figura 2: Secção transversal ductal da próstata indicando os tipos de células que estão presentes nos ductos prostáticos, incluindo células epiteliais secretoras luminais, células epiteliais basais, células neuroendócrinas, células musculares lisas estromais e candidatos a células-tronco. Para cada tipo de célula há uma lista de marcadores de diferenciação comumente usados para distinguir esses tipos celulares. Adaptado de MARKER *et al.*, (2003)

O epitélio prostático é formado por três tipos celulares, os quais podem ser identificados como: a) células basais; b) células neuroendócrinas; e c) células luminais (RATO *et al.*, 2015). As células basais são cerca de dez vezes mais numerosas no epitélio prostático de humanos em comparação ao de murinos. E acredita-se, que elas sejam responsáveis por monitorar o fluido prostático e promover a comunicação entre componentes epiteliais e estromais, participando assim da manutenção da homeostase tecidual. Além disso, evidências sugerem que células-tronco, assim como as células progenitoras da próstata, também compõem a população de células basais, que são independentes de andrógenos para a sua sobrevivência e são capazes de gerar diferentes tipos celulares *in vitro* e *in vivo* (SHUM, *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2014; TOIVANEN, *et al.*, 2016). Por sua vez, as células neuroendócrinas correspondem 1 a 2% das células epiteliais e possuem papel fundamental na regulação hormonal, crescimento, diferenciação e regulação dos processos secretórios da glândula (ABRAHAMSSON; DI SANT'AGNESE, 1993; RISBRIDGER; TAYLOR., 2006). Já as células luminais possuem elevada atividade secretora, sendo responsáveis pela síntese e secreção da maior parte dos componentes do líquido prostático, incluindo citratos, leucina aminopeptidases, fosfatases ácidas e enzimas proteolíticas, como os ativadores de plasminogênio e antígeno específico da próstata (PSA), os quais são essenciais para a movimentação dos espermatozoides após a ejaculação, garantindo a liquefação do sêmen (PRINS; LINDGREN, 2015).

O estroma, por outro lado, é composto por tecido conjuntivo e muscular liso, que variam em proporção e distribuição de seus componentes entre as diferentes espécies. Enquanto na próstata humana a musculatura lisa é abundante e se estende por todo o

estroma, em murinos, o estroma é predominantemente constituído por tecido conjuntivo frouxo, e as fibras musculares lisas estão concentradas em uma fina camada ao redor dos ácinos glandulares. Em ambas as espécies, o estroma também é composto por vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, bem como elementos do sistema imunológico, como mastócitos, macrófagos e linfócitos (HAYWARD et al. 1996).

Durante a ejaculação, a expulsão da secreção glandular prostática é facilitada pela contração da musculatura lisa presente no estroma prostático (RISBRIDGER; TAYLOR., 2006). Por sua vez, o tecido conjuntivo, é rico em fibras colágenas e fibroblastos, sendo estes capazes de sintetizar os componentes da matriz extracelular (MEC). Ao sintetizarem a MEC, as células influenciam a morfogênese e a homeostase da próstata, visto que a matriz é sede de moléculas reguladoras das atividades celulares, tanto do estroma quanto do epitélio.

O processo de síntese, em equilíbrio com a degradação dos componentes da matriz, origina a remodelação estromal, que ocorre normalmente durante o desenvolvimento da glândula em situações patológicas ou de redução androgênica (MAUNEY et al., 2010). Nessa fase atuam as metaloproteinases (MMPs), cuja família de enzimas é responsável por degradar proteoliticamente os elementos da MEC e proporcionar a remodelação estromal e a liberação de sinais que estimulam a angiogênese, a migração e a proliferação/diferenciação celular (TUXHORN et al., 2002).

De acordo com Risbridger e Taylor 2006, portanto, o estroma e o epitélio prostático são capazes de garantir um ambiente propício para o desenvolvimento e homeostase da glândula, por meio de uma ampla interação chamada epitélio-estroma. Essa interação é parácrina e recíproca, de forma que a porção estromal propicia o desenvolvimento e proliferação epitelial, enquanto o epitélio induz a diferenciação do estroma (CUNHA, 2008). Esse processo é fundamental para o crescimento e maturação pós-natal da glândula, além da manutenção do seu estado diferenciado e da sua responsividade a hormônios (CHUNG; ZHAU, 2001).

1.3. Resposta Androgênica

A próstata é uma glândula andrógeno-dependente, altamente sensível a distúrbios hormonais e dispõe de um complexo enzimático autônomo capaz de regular a produção de esteroides sexuais, ajustando o seu metabolismo de acordo com as suas necessidades (CUNHA et al., 2004; LABRIE et al. 2000).

O principal andrógeno do sistema genital masculino é a testosterona, produzida principalmente nas células de Leydig dos testículos, mediante estímulo do hormônio luteinizante (LH), e também nas adrenais (ZANG et al. 2017). Na próstata, a testosterona é convertida em 5- alfa-dihidrotestosterona (DHT) pela enzima 5-alfa-redutase, e, ambos têm sua ação mediada através da ligação e ativação de proteínas específicas, conhecidas como receptores de andrógenos (AR). No entanto, a DHT forma um complexo mais estável com o receptor, sendo o andrógeno biologicamente ativo na glândula (GROSSMANN et al., 2001).

Dessa forma, a ativação de AR é fundamental na diferenciação prostática, tanto no desenvolvimento embrionário quanto no seu funcionamento na vida adulta. Isso porque, em níveis fisiológicos normais, os andrógenos são capazes de regular a interação epitélio-estroma no estímulo das células estromais para a produção de fatores de sobrevivência, como o fator de crescimento epidermal (EGF) (VILAMAIOR et al., 2006, BANERJEE et al. 2001). Além disso, sua ação direta nos receptores de andrógenos das células epiteliais permite a diferenciação do epitélio luminal e regula a transcrição de proteínas requeridas para a função secretora da próstata (YUAN; BALK, 2009).

Ademais, ao lado dos andrógenos, outros hormônios como o estrogênio, insulina e glicocorticóides possuem impacto na glândula, sendo importantes também para a sua fisiologia (RIBEIRO et al., 2009).

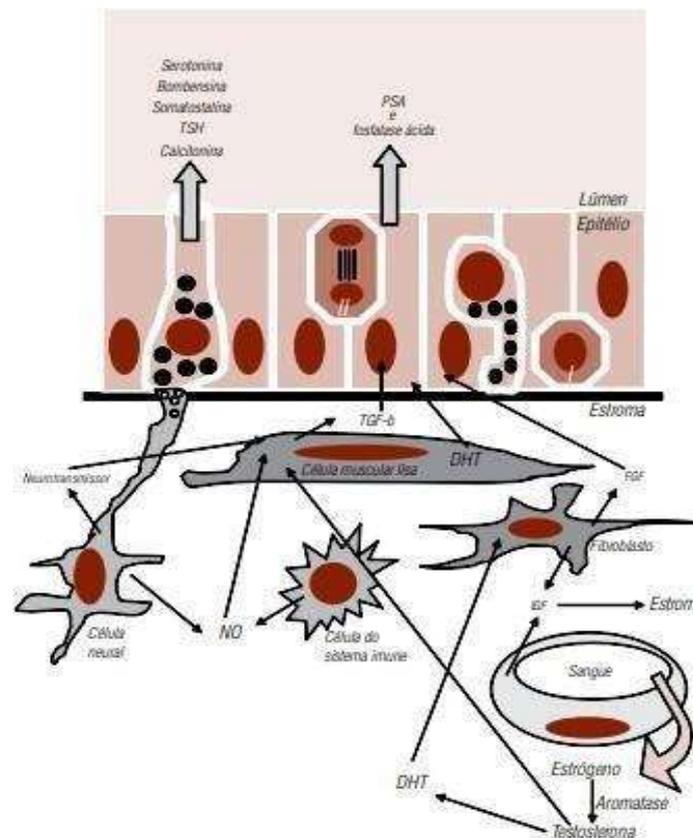


Figura 3: Inter-relações entre o compartimento estromal e epitelial prostático. Abreviações: FGF-b (fator de crescimento beta), DHT (diidrotestosterona), NO (óxido nítrico), FGF (fator de crescimento fibroblástico), PSA (antígeno prostático específico). Retirado de TABOGA et al., (2006).

1.4. Desenvolvimento da Próstata

No desenvolvimento prostático, o evento inicial na morfogênese ocorre a partir do seio urogenital (SUG), uma estrutura de linha média constituída por duas principais camadas, uma epitelial de origem endodérmica, envolta por uma camada mesenquimal de origem mesodérmica. O SUG se desenvolve de forma diferente entre as espécies, tal que em camundongos a aparição da estrutura se dá aproximadamente 13 dias após a concepção e em humanos se dá em 7 semanas de gestação. Além disso, os SUG são morfologicamente indistinguíveis entre os sexos até cerca de 17 dias pós concepção nos camundongos e 10-12 semanas de gestação em humanos, momento em que a morfogênese prostática se inicia e é dependente da exposição de andrógenos maternos (CHUNG et al., 1983).

Posterior ao estímulo androgênico há o crescimento de brotos epiteliais, do epitélio do seio urogenital (UGE) até o mesênquima do seio urogenital circundante (UGM). Inicialmente, os brotos prostáticos são cordões sólidos de células epiteliais que se desenvolvem e estabelecem as subdivisões lobulares da próstata. (**Figura 4**) (CUNHA et al., 1987; AARON et al., 2016). Já no início do período neonatal, os brotos intensificam o seu crescimento e canalizam. À medida que esses ductos se alongam dentro do UGM, eles começam a se bifurcar e a emitir ramos laterais (**Figura 4**), o que ocorre concomitantemente à citodiferenciação epitelial e mesênquimo-estromal.

Esse processo ocorre nas primeiras 2 a 3 semanas após o nascimento em ratos e camundongos. Ele acontece à medida que os cordões epiteliais sólidos se canalizam e o epitélio se reorganiza em duas populações celulares distintas. As células epiteliais basais, as quais formam uma camada descontínua de células e as células luminiais colunares, que se diferenciam e revestem lúmen. Por sua vez, o mesênquima/estroma prostático se diferencia em uma camada de músculo liso que circunda os ductos prostáticos (CUNHA et al., 2004).

Entre as semanas 3 e 6 pós-natal não há mudança histológica evidente. No entanto, a semana 6 é caracterizada pelo início de invaginações epiteliais e entre a semana 10 e 12 há o alargamento do lúmen e, conseqüentemente, com o acúmulo de secreção.

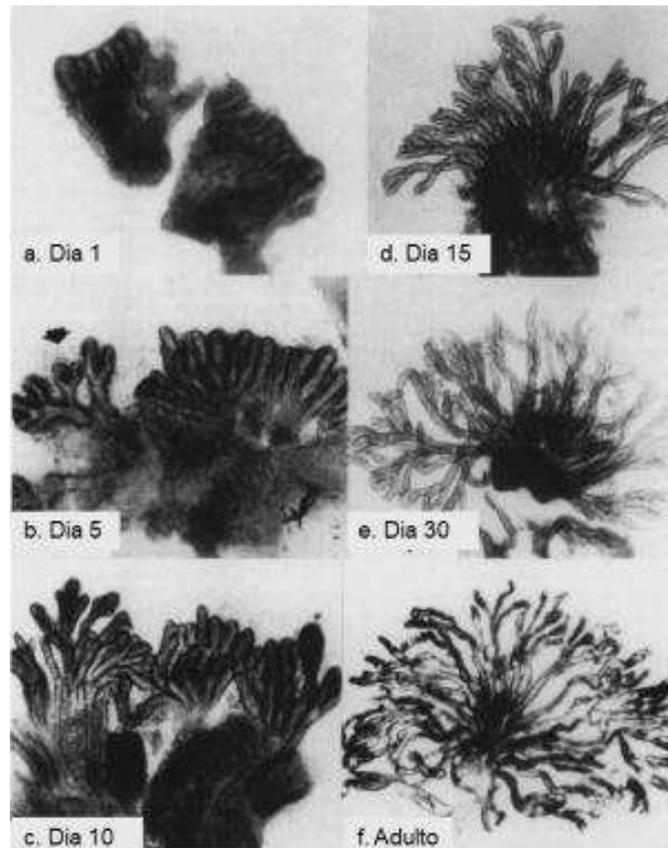


Figura 4: Morfogênese glandular pós-natal na próstata dorsolateral. No dia 1, diversos ductos principais estão imersos em um mesênquima denso. A ramificação distal inicia entre os dias 5 e 10 pós-natais. É importante observar que a próstata dorsolateral é composta por múltiplos ductos principais, cada um apresentando de três a seis ductos terminais (d-f). Adaptado de CUNHA et al., (1987).

Em relação à testosterona, sua concentração permanece baixa até a quinta semana pós-natal, e observa-se um aumento entre a sexta e oitava semana, atingindo seu pico na nona semana. Este pico é de extrema importância para o desenvolvimento, visto que ele é o responsável pela diferenciação da atividade secretora da glândula, e, ao mesmo tempo, estimula a proliferação e amadurecimento do epitélio acinar (VILAMAIOR et al., 2006). Logo, levando em consideração que grande parte do período de desenvolvimento da glândula ocorre após o nascimento, é indubitável que alterações no microambiente glandular durante essa fase podem acarretar prejuízos, tanto na formação, quanto no funcionamento da próstata.

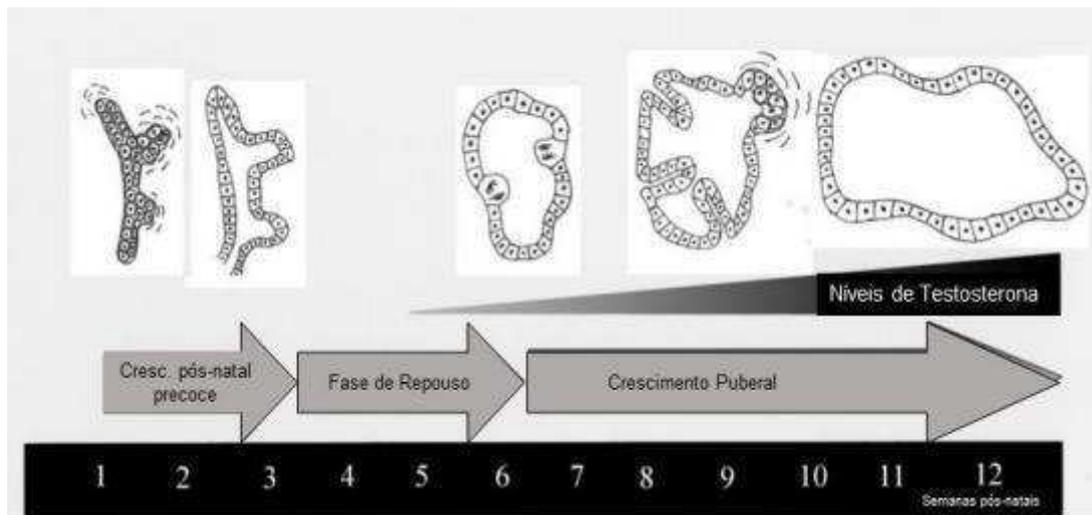


Figura 5: Representação esquemática do desenvolvimento da próstata durante as primeiras 12 semanas pós- natais. Adaptado de VILAMAIOR et al (2006).

1.5. Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF)

O fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) foi identificado há quase seis décadas como uma citocina pró-inflamatória secretada por linfócitos ativados, atuando na mediação de sobrenadantes de linfócitos T e na inibição da migração aleatória de macrófagos. No entanto, relatos sugerem que a circulação de MIF pelos tecidos ocorre a partir de estoques intracelulares pré-formados, o que justifica a sua expressão em uma variedade de células imunes e não imunes e a sua distribuição quase onipresente nos tecidos (CALANDRA & ROGER., 2003). Na próstata, por exemplo, evidências sugerem que o MIF é produzido e expresso pelas células do epitélio glandular e, o nível de expressão varia conforme o estágio de desenvolvimento do organismo e o estado de doença na glândula (MEYER-SIEGLER ; HUDSON, 1996; MEYER-SIEGLER et al., 2005). Com isso, pesquisas ao longo dos anos constataram que o MIF possui um papel muito mais abrangente, atuando como enzima, na mediação da tautomerase D-dopacromo, fenilpiruvato ceto- enol isomerase e tiol-proteína em atividade oxidoreductase, e como citocina, na mediação da imunidade inata e adquirida, e na regulação da inflamação (MERK at al., 2012 ; CHEN et al. 2022)

O MIF exerce sua ação, principalmente, ligando-se aos seus receptores cognatos nas células-alvo e ativando a sinalização downstream. O principal receptor identificado é o CD74, cujo MIF se liga com alta afinidade (LENG et al., 2003). Além do CD74, a sinalização de

araquidonato/prostaglandinas. A produção de MIF é estimulada por LPS através dos TLRs, regulando respostas imunes inatas e aumentando a expressão do TLR-4 em resposta a bactérias Gram-negativas. O MIF também antagoniza os efeitos dos glicocorticoides, inibindo a resposta inflamatória. Além disso, inibe a apoptose induzida por ativação, promovendo a sobrevivência e a proliferação celular. Suas principais funções incluem a estimulação de fatores pró-inflamatórios, ativação de moléculas de adesão, aumento do tráfego celular para inflamação e inibição da apoptose. Retirado de Matejuk et al., 2004.

Dessa forma, constata-se que o MIF é um importante regulador tumorigênico e inflamatório, ao passo que ativa mecanismos antiapoptóticos, pró-proliferativos e pró-inflamatórios. Nesse contexto, tem sido implicado na patogênese de diversas doenças inflamatórias agudas e crônicas incluindo sepse (CALANDRA et al., 2003), asma (YAMAGUCHI et al., 2000), doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico (BURGUER et al., 2002), distúrbios metabólicos, como diabetes tipo 2 e obesidade (FINUCANE et al., 2014) e câncer (KINDT et al. 2013).

Em relação ao câncer, estudos apontam que a expressão de MIF tem seu aumento relacionado ao processo de metástase, sendo influenciado pelo crescimento celular (SIMPSON et al., 2013). Muitos estudos demonstraram uma superexpressão de MIF em condições patológicas, como prostatite crônica e adenocarcinoma prostático metastático (MEYER-SIEGLER; HUDSON, 1996; MEYER-SIEGLER et al., 2005).

Estudos recentes têm destacado o papel crítico do fator inibidor de migração de macrófagos na sobrevivência e proliferação de células tumorais. Lue et al. (2007) demonstraram que, em células de carcinoma do colo do útero (linhagem HeLa) e em várias linhagens de câncer de mama, o MIF desempenha um papel protetor ao prevenir a apoptose e promover a sobrevivência celular, ativando diretamente a via Akt. Essa ativação é crucial para a manutenção da viabilidade celular em ambientes tumorais adversos. Adicionalmente, a análise de modelos animais deficientes em CD74 e MIF (-/-) revelou uma significativa redução na formação tumoral, angiogênese e agressividade do tumor, sugerindo que a inibição do MIF pode ser uma estratégia terapêutica promissora. Essa relação entre MIF e agressividade tumoral não se limita apenas ao câncer de mama e colo do útero, uma vez que estudos têm mostrado que o MIF está envolvido na progressão de diversos tipos de câncer.

Por exemplo, em câncer de pulmão, a expressão elevada de MIF tem sido associada a um pior prognóstico, com a modulação dessa proteína levando à redução da invasividade celular e da formação de metástases (DENG et al., 2019). Em câncer colorretal, o MIF

também tem sido identificado como um fator que contribui para a angiogênese e a resistência à terapia, reforçando a ideia de que sua inibição pode potencialmente melhorar os resultados clínicos (ZHANG et al., 2020).

Essas evidências corroboram a importância do MIF como um mediador central na oncogênese e sugerem que intervenções que visem a modulação de sua atividade poderiam abrir novas oportunidades para o tratamento de diferentes tipos de câncer, tornando-se um alvo terapêutico relevante em pesquisas futuras.

1.6. Justificativa

Tendo em vista, as etapas de desenvolvimento prostático e a importância da proliferação celular nesse processo, e ainda, a relevância do MIF no desencadeamento das vias de sinalização referentes à proliferação e morte celular, faz-se necessário compreender de fato, se a ausência de MIF nas etapas pós-natais, período da formação de estruturas fundamentais na funcionalidade da glândula, influencia de alguma forma no desenvolvimento da próstata e, dessa forma, compreender melhor a influência do MIF em sua morfogênese. Todavia, entender a atividade biológica do MIF na próstata dorsal também é importante, uma vez que esse lobo possui homologia histopatológica e resposta androgênica correspondente à zona periférica da próstata humana, e, esta zona é o principal alvo acometido por neoplasias em seres humanos. Além disso, a supressão de MIF tem sido proposta como terapia contra o câncer. Diante disso, este estudo visa esclarecer se a ausência de MIF trará prejuízos ao funcionamento da próstata e ainda, se a inibição do mesmo pode ser feita em qualquer idade pós-natal sem que haja prejuízos na morfogênese e funcionalidade da glândula.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analizar o papel do Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF) no desenvolvimento do lobo dorsal da próstata de camundongos.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a histoarquitetura da próstata dorsal
- Estudar o conteúdo de células proliferativas
- Investigar o papel de MIF na interação epitélio-estroma da glândula, através de estudo de células musculares, fibroblastos e sua relação com a proliferação epitelial.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Para a realização deste projeto foram utilizados camundongos C57BL/6 machos (n=60) adultos, com 30 e 60 dias de idade, sendo 30 deles knockout para MIF. Os animais, fornecidos pela Rede de Biotérios de Roedores (REBIR), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), foram mantidos a 21°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração. Os grupos experimentais foram designados como C30 e C60 para os animais controles de 30 e 60 dias de idade, respectivamente, e M30 e M60 para os animais knockout para MIF de 30 e 60 dias, respectivamente. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU; protocolo 030/21).

Os animais foram eutanasiados seguindo o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), por overdose de Quetamina (Zetnil®) e Cloridrato de Xilazina 2% (Zetnil®) na proporção de 1:1 (0,2 mL/100g) por via i.p. O peso corporal e da próstata foram avaliados no momento da eutanásia. O sangue foi coletado por meio de punção cardíaca.

3.2. Análise morfológica

A próstata de todos os grupos (n=5/grupo) foi fixada por imersão em solução de Metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético) por 3 horas sob refrigeração a 4°C. Após a fixação, o tecido foi desidratado em etanol, clarificado e incluído em parafina.

Em seguida, o tecido foi seccionado (4µm) em um micrótomo rotativo (Leica) e os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para estudos de histoarquitetura geral e Picrosirius - hematoxilina para caracterização da deposição de colágeno. Para todos os

grupos, lâminas H&E foram utilizadas para análise estereológica que avaliou a frequência relativa do epitélio, lúmen e estroma da próstata. Essa análise usou o método Weibel de contagem de pontos (WEIBEL, 1974), que consiste na aplicação de um retículo contendo 100 pontos sobre a imagem histológica, com auxílio do software IMAGE J (National Institute of Health, EUA, <https://imagej.nih.gov/ij>). Cada ponto que tocar o epitélio, lúmen ou estroma é contado e os dados foram expressos como uma porcentagem da área total (frequência relativa). Esta análise histológica foi realizada na próstata de 5 animais/grupo, 10 imagens por corte.

A distribuição de colágeno foi quantificada em todos os grupos usando imagens de próstata de Picrosirius-hematoxilina (n=5; 10 imagens/corte). A quantificação foi realizada com a mesma metodologia de contagem de pontos acima descrita.

3.3. Análises imunocitoquímicas

Para essa análise, foram aplicados ensaios imunocitoquímicos nos cortes histológicos, para que, seja possível a detecção da presença e distribuição de células proliferativas (PCNA), músculo liso (alfa-actina de músculo liso), fibroblastos (vimentina). Para isso, os cortes foram imersos em tampão citrato pH 6,0 e aquecidos a 98°C por 15 minutos para a recuperação antigênica. Logo após, o bloqueio da atividade de peroxidase endógena foi efetuado tratando-se os cortes com H₂O₂ (3%) em metanol por 20 minutos. A seguir, o bloqueio de interações proteicas inespecíficas foi realizado através de albumina sérica bovina (4%) em PBS e soro normal de cavalo. Depois, os cortes foram incubados nos anticorpos primários “overnight” a 4°C, diluídos 1:100 em BSA4%. Então, após serem lavados em PBS, os cortes passaram pela incubação com sistema de detecção polímero (Biocare) por 1 hora em temperatura ambiente. A revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB), com tempo padronizado para cada anticorpo estudado e a contra- coloração em hematoxilina de Harris.

As células proliferativas foram quantificadas com base na contagem dos núcleos marcados com PCNA, usando 10 imagens da próstata adquiridas em objetiva 40X, usando 5 animais por grupo. As células musculares e fibroblastos foram quantificadas pelo mesmo sistema de contagem de pontos descrito anteriormente.

3.4. Avaliação de apoptose

A apoptose foi avaliada em amostras de próstata pelo kit EnzCheck Caspase-3 Assay (Thermo Fisher®), que quantifica os níveis de caspase-3 em sua forma ativa. Para isso, as próstatas foram homogeneizadas em RIPA buffer, centrifugadas a 14000 rpm e o sobrenadante com o conteúdo protéico das amostras foi coletado. O conteúdo de caspase-3 foi mensurado utilizando o reagente ZDEVD (substrato da caspase-3), segundo recomendações do fabricante e expresso com intensidade de fluorescência normalizada pela concentração de proteína em cada amostra. Para cada grupo experimental, foram usadas 5 amostras, sendo que nos grupos de 30 dias, cada uma irá conter um pool de 2 próstatas, já em 60 dias 1 próstata representou 1 amostra.

3.5. Quantificação de testosterona por ELISA

A dosagem de testosterona foi realizada com o kit Testosterone ELISA (Cayman® 582701), seguindo as instruções do fabricante. O experimento foi realizado com amostras de plasma de camundongos, com 30 e 60 dias de idade de ambas as linhagens animal (n=4 por grupo), as quais foram obtidas através da centrifugação do sangue coletado no momento da eutanásia. Cada amostra foi lida em duplicata e a sensibilidade mínima do teste foi de 6pg/mL.

3.6. Análise estatística

Todos os dados numéricos desta pesquisa foram avaliados estatisticamente por teste ANOVA a partir da distribuição amostral de cada parâmetro, avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, testes de múltiplas comparações entre grupos foram realizados, utilizando testes Tukey Test e Kruskal-Wallis. Estes foram escolhidos uma vez que os dados anteriores passaram ou não no teste de normalidade, respectivamente. Para tanto, foi utilizado o programa Bioestat 4.0 (Software Informer., BRA).

4. RESULTADOS

4.1. Dados Biométricos

Os resultados obtidos mostram que, ao comparar as idades, há um aumento dos parâmetros biométricos de 30 para 60 dias, tais como peso corporal e peso da próstata, tanto

nos animais controle e MIF^{-/-} (**Tabela 1**). No entanto, o ganho de peso é 12% menor no curso do desenvolvimento de MIF do que nos animais selvagens. Quando comparamos as linhagens com mesma idade, observamos que o grupo M60 tem menor peso corporal, enquanto o grupo M30 apresentou maior peso bruto e relativo da próstata (**Tabela 1**).

GRUPO	PESO CORPORAL (G)	PESO DA PRÓSTATA (G)	PESO RELATIVO
C30	16,259	0,023	0,001
M30	17,123	0,039 *	0,002 *
C60	25,608 #	0,068 #	0,003 #
M60	23,335 * #	0,060 #	0,003

Tabela 1: Dados biométricos - peso corporal, peso da próstata e peso relativo da próstata de camundongos com 30 e 60 dias de idade; controle (C30, C60) e MIF knockout (M30, M60) # Diferença estatística ($p < 0.05$) na comparação entre idades do mesmo grupo; * $p < 0.05$ na comparação entre controle e MIF de mesma idade.

4.2. Estereologia

A análise estereológica demonstrou redução epitelial em animais MIF^{-/-} aos 30 dias. Com relação ao compartimento estromal e luminal não houveram diferenças significativas entre as linhagens, somente alteração em decorrência da idade como aumento do lúmen (**Figura 7**).

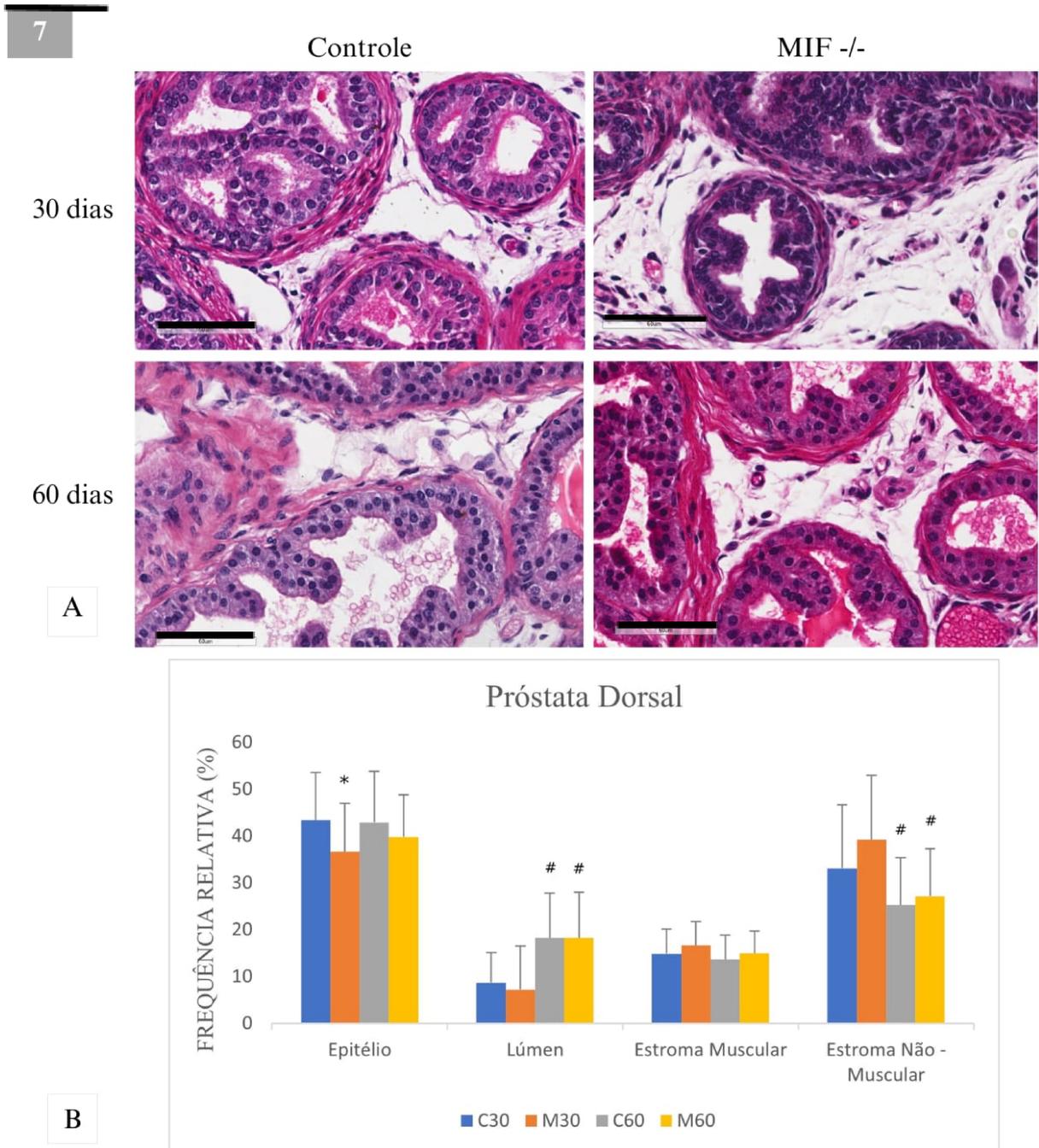


Figura 7: Seções histológicas da próstata dorsal de camundongos, sendo representados pelos grupos controle e MIF^{-/-}, nas idades de 30 e 60 dias. Coloração por hematoxilina e eosina (A). Frequência relativa de epitélio, lúmen, estroma muscular e estroma não muscular (B). * Diferença estatística ($p < 0,05$) ao comparar grupos da mesma idade. # Diferença estatística ($p < 0,05$) ao comparar idades dentro do mesmo grupo. Barra de escala: 50 μ m

4.3. Avaliação de células proliferativas

A quantificação de células em proliferação celular demonstra que há uma redução expressiva de 75% na proliferação entre as idades de 30 para 60 dias no grupo controle. No entanto, o grupo M30 já apresenta uma redução significativa de proliferação nessa idade, mantendo estável aos 60 dias, o que faz com que a sua proliferação celular seja maior do que aquela observada em C60 (**Figura 8**).

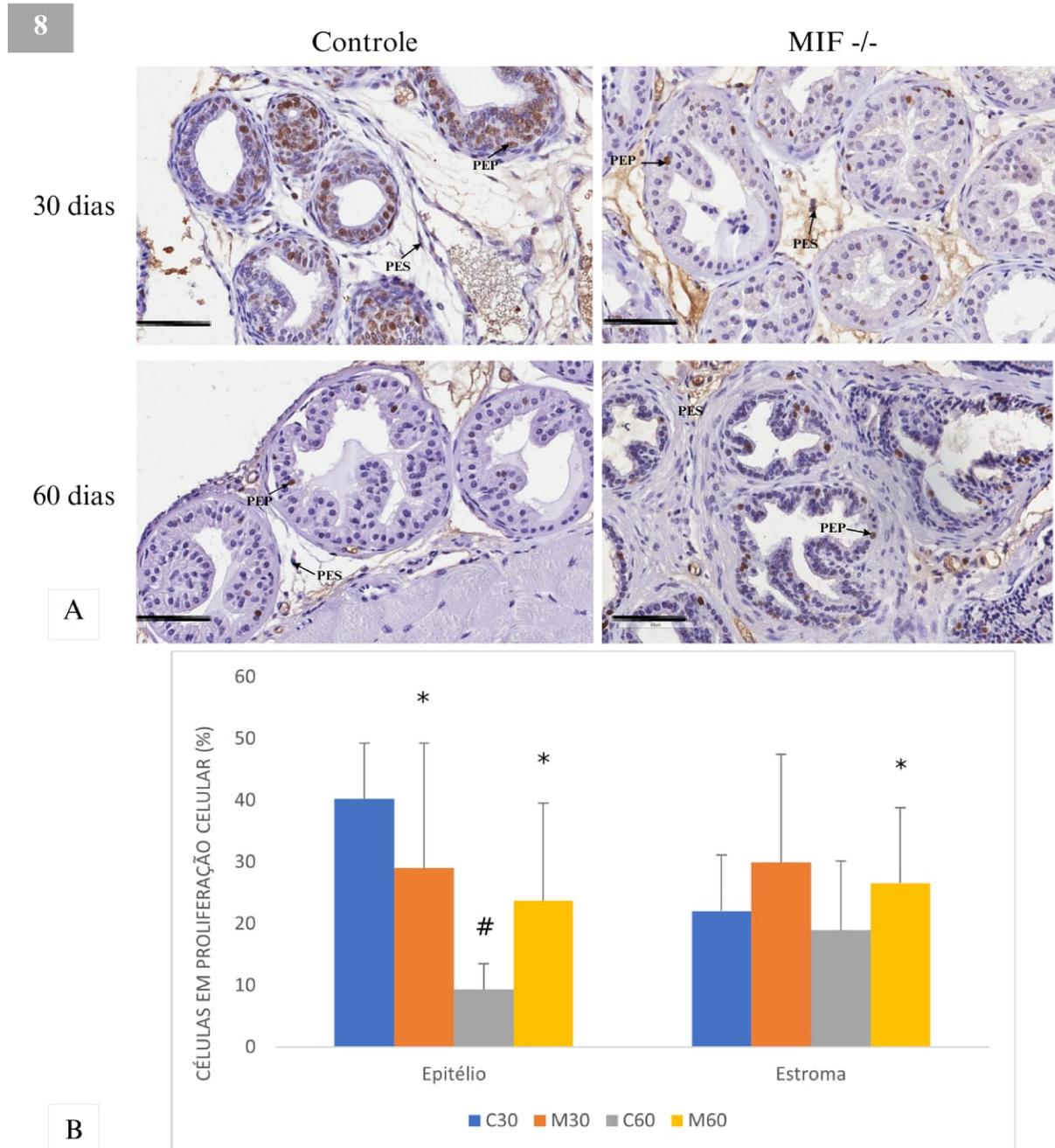


Figura 8: Seções histológicas da próstata dorsal de camundongos, sendo representados pelos grupos controle MIF^{-/-}, nas idades de 30 e 60 dias. Imunohistoquímica para pena (A). Quantificação de células em

proliferação (B). * Diferença estatística ($p < 0,05$) ao comparar grupos da mesma idade. # Diferença estatística ($p < 0,05$) ao comparar idades dentro do mesmo grupo. *Abreviações: PEP: Proliferação Epitelial ; PES: Proliferação Estromal.* Barras de escala= 50 μ m

4.4. Avaliação estromal

A avaliação dos cortes corados com Picrosírius mostrou que há uma redução de fibras colágenas entre as idades tanto em animais controle quanto em knockouts (**Figura 9**). No entanto, não houve alteração na frequência de colágeno entre grupos estudados com a mesma idade (**Figura 9**).

Na imunomarcação para α -actina foi observada a presença de células que circundam os brotos prostáticos, região onde as células mesenquimais se diferenciam em células musculares lisas (**Figura 10**). Quanto à frequência relativa de músculo liso, tanto entre idades quanto entre grupos, não houve alteração significativa (**Figura 10**).

A quantificação de vimentina demonstrou que os fibroblastos se mantem com a mesma distribuição da idade de 30 para 60 dias no grupo controle. No entanto, houve um aumento significativo dessas células no grupo MIF^{-/-} 30 dias que foi 2 vezes maior do que o encontrado em animais controle (**Figura 11**).

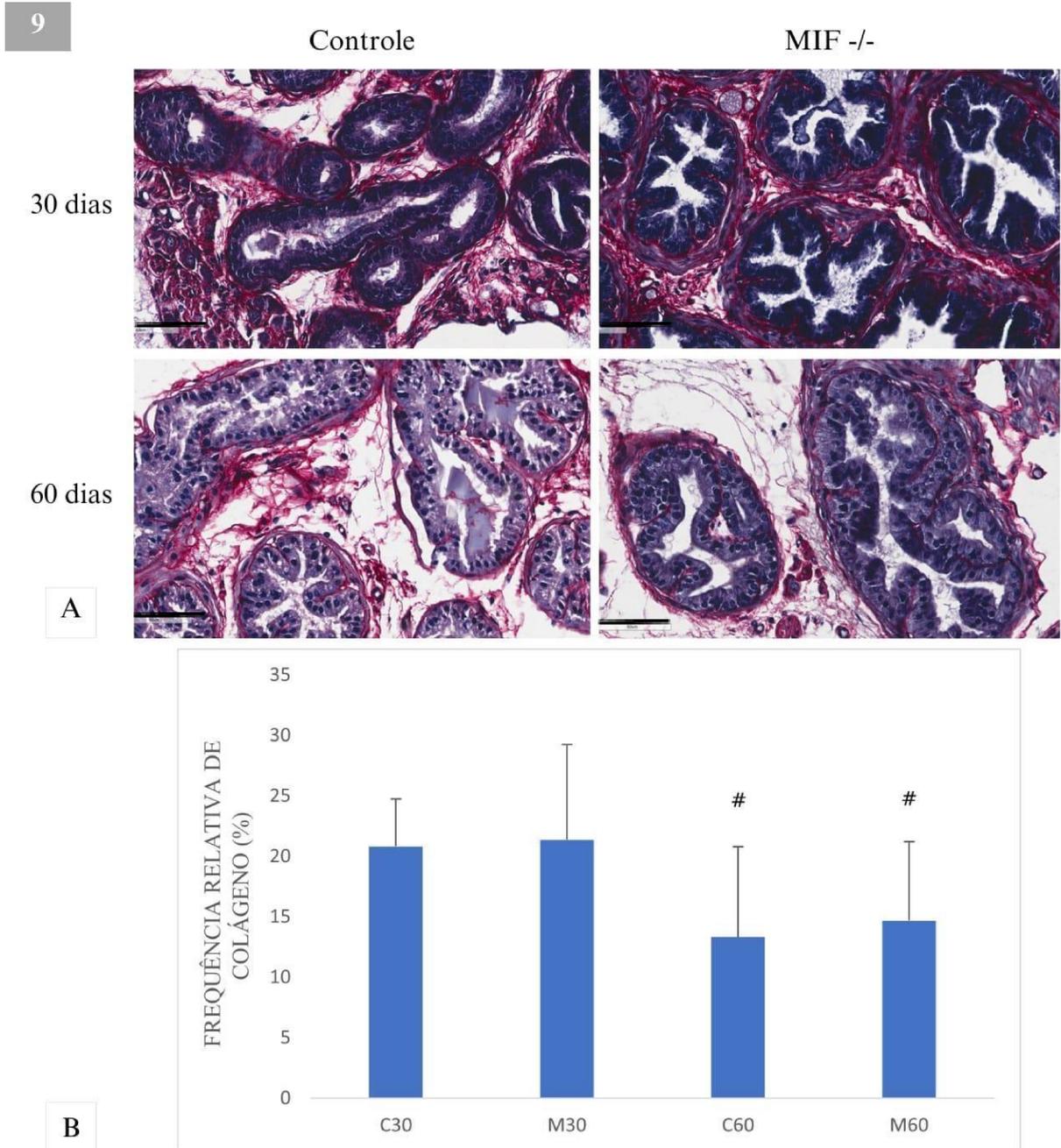


Figura 9: Seções histológicas da próstata dorsal de camundongos, sendo representados pelos grupos controle e MIF^{-/-}, nas idades de 30 e 60 dias. Coloração por Picrosirius (A). Frequência relativa de colágeno (B). * Diferença estatística ($p < 0,05$) ao comparar grupos da mesma idade. # Diferença estatística ($p < 0,05$) ao comparar idades dentro do mesmo grupo. Barras de escala= 50 μ m

Os resultados revelaram que há uma tendência de aumento de apoptose no decorrer do desenvolvimento de 30 para 60 dias (**Figura 7**). No entanto, no grupo MIF $-/-$ em 60 dias a apoptose é 50% maior do que em 30 dias. Além disso, quando comparado com o grupo controle, os níveis de apoptose são significativamente maiores no grupo M60 (**Figura 7**).

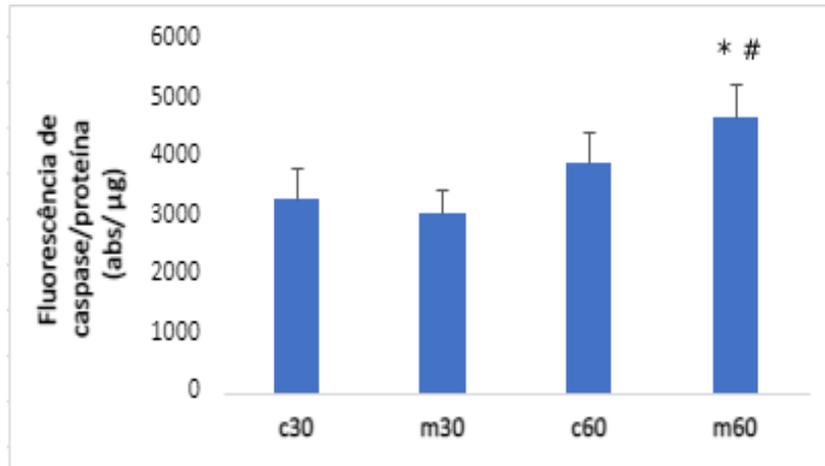


Figura 12: Níveis de caspase-3 ativa na próstata de camundongos com 30 e 60 dias de idade; controle (C30, C60) e MIF knockout (M30, M60). * Diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparados grupos da mesma idade. # Diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparadas idades do mesmo grupo.

4.6. Níveis séricos de Testosterona (T)

A quantificação de testosterona demonstrou um aumento significativo em relação às idades no grupo controle. No grupo MIF $-/-$ 30 dias a testosterona já é mais de 5X maior do o esperado para essa idade, estabilizando esses níveis até a idade de 60 dias. Portanto, não se observa esse aumento esperado de T da idade pré-púbere para púbere nos animais knockout (**Figura 8**).

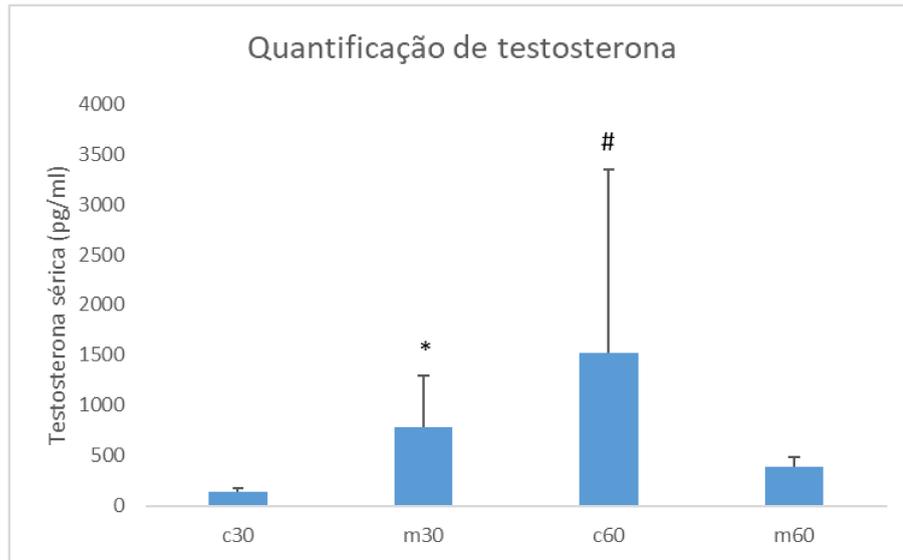


Figura 13: Níveis de testosterona sérica de camundongos com 30 e 60 dias de idade; controle (C30, C60) e MIF knockout (M30, M60). * Diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparados grupos da mesma idade. # Diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparadas idades do mesmo grupo.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento prostático em camundongos é um processo crítico que ocorre principalmente nas primeiras semanas de vida e é iniciado pela ação androgênica pré-natal. Durante esse período, a próstata é sensível a baixos níveis de andrógenos e o aumento desses níveis promove o crescimento da glândula (PRINS et al., 2001). Segundo Franck-Lissbrant e Hayward; Cunha (1998 ; 2000), a testosterona estimula a ramificação ductal, a canalização e a citodiferenciação epitelial, ocasionando um salto de crescimento caracterizado por um aumento no peso úmido da glândula, e ainda, um pequeno aumento no número de ductos prostáticos. Esse crescimento é fundamental para garantir a formação de uma próstata funcional e prepará-la para suas atividades na vida adulta. Em relação às análises biométricas, observa-se que entre 30 e 60 dias, há um aumento significativo no peso da próstata, refletindo o impacto esperado dos andrógenos na proliferação celular e na maturação do tecido prostático normal. Não existem estudos sobre o desenvolvimento da próstata em camundongos MIF knockout. No entanto, podemos considerar que o aumento do peso da próstata em animais MIF^{-/-} aos 30 dias, em comparação com o grupo controle da mesma idade, pode estar associado aos altos níveis de testosterona encontrados neste grupo. Embora a ausência de MIF possa ter efeito negativo na proliferação celular, o efeito

anabolizante da T deve ter estimulado mais a área estromal e tal estímulo deve acontecer antes dos 30 dias, impactando no peso na fase pré-púbere.

Em relação à proliferação celular, a redução entre idades, de 30 para 60 dias, é esperada, uma vez que picos de proliferação no início do desenvolvimento são cruciais para a morfogênese da glândula e, a perpetuação dessa proliferação poderia provocar o crescimento aberrante da próstata nas fases posteriores (CUNHA et al., 2008). Nessa investigação, encontramos uma redução de proliferação epitelial em MIF^{-/-} aos 30 dias. Esse resultado vai de encontro com os dados da estereologia que mostram uma redução na área epitelial neste grupo. MIF é uma citocina responsável por ativar vias proliferativas como MAPK/ERK e PI3K/AKT e a sua expressão se dá, com maior frequência, nas células epiteliais glandulares da próstata quando comparado ao estroma (MEYER-SIEGLER., 1998). Assim sendo, a sua ausência é capaz de ocasionar um desequilíbrio proliferativo no ácino prostático. Destaca-se que a redução da proliferação celular em animais MIF^{-/-} pré-púberes deve ser interpretada como uma antecipação do curso do desenvolvimento, uma vez que a redução das taxas proliferativas é algo que normalmente acontece entre 30 e 60 dias. Já, o aumento em MIF^{-/-} 60 dias, não é esperado se comparado ao controle de mesma idade. Assim, sugerimos que há uma tentativa do tecido de restaurar a proliferação celular, a qual seria essencial para o desenvolvimento da glândula. Esse aumento pode ter sido estimulado por vias secundárias de proliferação como mTOR e EGF/EGFR, que também regulam a proliferação celular, cada uma atuando de maneira independente da presença de MIF. A via mTOR desempenha um papel crucial na regulação da proliferação celular, sendo ativadas por diversos sinais, incluindo nutrientes, fatores de crescimento e estresse celular (SAXTON & SABATINI, 2017). Pesquisas indicam que a ativação do mTORC1 (complexo 1 da mTOR) promove a proliferação celular independentemente da presença de MIF, sugerindo que outras moléculas e vias de sinalização podem compensar a ausência deste fator (DAZERT & HALL, 2011). Por sua vez, a via EGF/EGFR (Fator de Crescimento Epidérmico/Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico) também desempenha um papel crucial na regulação da proliferação celular pois sua ativação ativa várias cascatas de sinalização, incluindo as vias MAPK/ERK e PI3K/AKT (YARDEN & SLIWKOWSKI, 2001). Em síntese, a interdependência e a atividade dessas vias revelam a complexidade da regulação do crescimento celular, destacando a capacidade de impulsionar a proliferação em ausência de MIF, além de influenciar a resposta inflamatória e a sobrevivência celular.

Além disso, outro fator capaz de propiciar o aumento da proliferação em MIF^{-/-} aos

60 dias é a tautomerase D-dopacromo (DDT). O DDT ou MIF-2, é um homólogo funcional do MIF e demonstra afinidade pelo receptor CD74 de MIF, devido às suas propriedades estruturais e enzimáticas semelhantes. (MEZA-ROMERO et al., 2016). Estudos demonstram ainda que células deficientes em DDT apresentaram diminuição da fosforilação de ERK, muito parecido com o que foi descoberto anteriormente para o knockdown de MIF (VALDEZ et al., 2023). Além disso, experimentos em células de câncer pancreático, como as linhagens celulares PANC-1 demonstraram que tanto a inibição de MIF quanto a de DDT diminuíram os níveis fosforilados de ERK e AKT (GUO et al., 2016 ; COLEMAN et al., 2008). Coletivamente, esses resultados mostram que DDT e MIF têm contribuições semelhantes no crescimento celular e que, o DDT, pode ter sido um fator essencial para o aumento proliferativo na idade de 60 dias, na tentativa de restaurar a reduzida proliferação encontrada no grupo de 30 dias, ao induzir a ativação de vias proliferativas em animais knockout para MIF.

Além da proliferação celular, esse estudo investigou também o papel de MIF no estroma prostático, uma vez que ele apresenta papel relevante no desenvolvimento da próstata. Enquanto o conteúdo de células musculares lisas não foi diferente entre os grupos, encontramos uma maior quantidade de fibroblastos nos animais MIF^{-/-} aos 30 dias. Dados estereológicos confirmam esses achados. Embora a proliferação celular no estroma seja significativa somente no grupo M60, houve uma tendência de aumento também no grupo MIF^{-/-} 30 dias e isso explicaria a maior quantidade de fibroblastos encontrada neste grupo. Não existe na literatura dados sobre o papel de MIF ou sua inibição no estroma da próstata. No entanto, KIM et al, 2020 observou que no tecido adiposo a ausência da citocina MIF pode levar a uma resposta compensatória, resultando em um aumento na viabilidade de fibroblastos. Essa resposta pode estar associada mais uma vez ao DDT, uma vez que este está associado ao aumento da quimiocinese dos fibroblastos (SZCZEŚNIAK et al., 2021). Os fibroblastos são células importantes no estroma pois sintetizam a matriz extracelular, rica em colágeno, para dar suporte na sustentação dos ácinos secretores, além de estimular a diferenciação e proliferação do epitélio através da produção de fatores de crescimento (DI CARLO & SORRENTINO, 2024). Embora tenha sido observado uma maior quantidade de fibroblastos, isso não refletiu em aumento na síntese de colágeno nos grupos MIF^{-/-}. As possíveis explicações para isso devem-se a uma maior síntese e ativação de metaloproteinases, que poderiam degradar o colágeno, desequilibrando a sua produção/degradação. Além disso, é possível que no momento da obtenção dos tecidos houvesse uma menor ativação dos fibroblastos, pois, ainda que as células existam, elas

precisam ser estimuladas para a produção da matriz extracelular. Nesse aspecto, o TGF- β é o principal fator que ativa o fibroblasto na síntese de colágeno e no início do desenvolvimento, o epitélio da próstata é o principal secretor desse fator que estimula o estroma numa interação parácrina (GERDES et al., 1998). Como há uma redução da proliferação no epitélio no grupo M30, os níveis de TGF podem ter sido reduzidos, diminuindo o estímulo para produção de colágeno, mesmo na presença de uma maior quantidade de fibroblastos estromais. Corroborando com essa ideia, Zhang et al., (2021) demonstraram que o tratamento de fibroblastos com a citocina MIF, aumenta a expressão de TGF enquanto a inibição de MIF diminui esse fator de crescimento. Dessa forma, mostramos que MIF tem influência na distribuição de fibroblastos na fase púbere do desenvolvimento da próstata.

A análise da atividade de caspase-3 demonstrou um aumento significativo em animais knockout para MIF aos 60 dias. Embora não existam estudos diretos sobre a atividade apoptótica mediada por caspase-3 na próstata, o grupo sugere algumas possíveis discussões que podem ser pertinentes ao contexto atual. Nesse sentido, Tapia-Vieyra et al., (2001) relataram que a apoptose desempenha um papel fundamental na regulação do crescimento prostático e na manutenção da homeostase celular. Isso se deve ao fato de que a ativação da caspase-3 durante o desenvolvimento pode ser um mecanismo crucial para a eliminação de células que não estão mais em necessidade, como na canalização dos ductos prostáticos nos primeiros dias de vida, ou que apresentem anomalias. Essa ativação tende a ser maior em camundongos na faixa etária de 30 dias, refletindo um período crítico de desenvolvimento da próstata e pode continuar a aumentar até os 60 dias. No entanto, estudos mostram que o MIF tem um efeito protetor sobre a sobrevivência celular e a ausência desse fator resulta em um ambiente em que a apoptose é facilitada. Shimizu et al., (2010) indicaram que o MIF atua como um regulador positivo da sobrevivência celular, e sua ausência pode levar a uma desregulação das vias de sinalização que normalmente inibem a apoptose. Além disso, De et al (2018) observaram que o silenciamento do MIF *in vitro* inativou a sinalização da via CD74–NF- κ B, o que induziu a apoptose. Portanto, é plausível considerar que o aumento na atividade de caspase-3 observado nos camundongos MIF^{-/-} pode ter implicações significativas para a dinâmica do crescimento prostático e a homeostase, indicando uma possível desregulação dos mecanismos apoptóticos que, em condições normais, são essenciais para o desenvolvimento da próstata.

6. CONCLUSÃO

- 1) MIF possui maior impacto no compartimento epitelial da próstata dorsal de camundongos, e a sua ausência tem papel redutor na proliferação e a subsequente redução dessa área tecidual. Dessa forma, é possível concluir que essas alterações podem resultar em prejuízos na capacidade secretora da próstata, bem como nas sinalizações mediadas pela interação epitélio-estroma.
- 2) Além disso, a ausência de MIF alterou, em maior proporção, a fase inicial do desenvolvimento prostático. No entanto, a glândula atuou tentando restabelecer as alterações epiteliais e evitar maiores danos. Sugerimos, portanto, que tal resultado esteja relacionado à ativação das vias secundárias de proliferação.
- 3) O estroma foi menos impactado pela ausência de MIF na próstata. No entanto, o aumento de fibroblastos pode ocasionar fibrose tecidual se esses forem ativados para secreção de colágeno na vida adulta, prejudicando a arquitetura glandular.
- 4) O uso do modelo knockout para MIF mostrou pela primeira vez que essa citocina tem relevância no processo de maturação da glândula, viabilizando que esta atinja um arranjo tecidual que possibilite o desempenho normal das funções fisiológicas e sexuais do homem.

7. REFERÊNCIAS

- AARON, L., FRANCO, O., & HAYWARD, S. (2016). Review of prostate anatomy and embryology and the etiology of benign prostatic hyperplasia. *The Urologic Clinics of North America*, 43(3), 279-88.
- ABRAHAMSSON PA, DI SANT'AGNESE PA. Neuroendocrine cells in the human prostate gland. *Journal of andrology*. 1993;14(5):307-9.
- AMIN M, KHALID A, TAZEEN N, YASOOB M. Zonal anatomy of prostate. *Ann King Edward Med Uni*. 2010;16(3):138-42.
- BALK SP, KO YJ, BUBLEY GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*. 2003;21(2):383- 91.

BANERJEE PP, BANERJEE S, BROWN TR. Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the brown Norway rat prostate. *Endocrinology*. 2001;142(9):4066-75.

BERNHAGEN, J., KROHN, R., LUE, H. *et al.* MIF é um ligante não cognato dos receptores de quimiocinas CXC no recrutamento de células inflamatórias e aterogênicas. *Nat Med* 13, 587–596 (2007).

BORST SE, CONOVER CF, CARTER CS, GREGORY CM, MARZETTI E, LEEUWENBURGH C, VANDENBORNE K, WRONSKI TJ. "Anabolic effects of testosterone are preserved during inhibition of 5alpha-reductase." *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Aug;293(2) . doi: 10.1152/ajpendo.00130.2007. Epub 2007 May 8. PMID: 17488806.

BURDEN, H., HOLMES, C., PERSAD, R., & WHITTINGTON, K. (2006). Prostatosomas--their effects on human male reproduction and fertility. *Human Reproduction Update*, 12(3), 283-92.

BURGUER-KENTISCHER A., KLEEMANN R., HAUSSER A., GEIGER G., MISCHKE R., FLIEGER O., JOHANNES F.J., ROGER T., CALANDRA T., KAPURNIOTU A., GRELL M., FINKELMEIER D., BRUNNER H., BERNHAGEN J., Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1, *Nature* 408 (2000) 211–216.

CALANDRA, T. & ROGER, T. Fator inibidor da migração de macrófagos: um regulador da imunidade inata. *Nat. Rev.* 3, 791-800 (2003).

CHEN, E., SHAH, D., BHANDARI, V., & LISI, G. (2022). A structurally preserved allosteric site in the MIF superfamily affects enzymatic activity and CD74 activation in D-dopachrome tautomerase. *The FASEB Journal*, 36.

CHUNG, L., & CUNHA, G. (1983). Interações estromais-epiteliais: II. Regulação do crescimento prostático pelo mesênquima do seio urogenital embrionário. *A Próstata* , 4.

CHUNG, L. W. K.; ZHAU, H. E. Stromal-Epithelial Interaction. *Prostate Cancer: Biology, Genetics, and the New Therapeutics*, p. 341–362, 2001.

COLEMAN AM., RENDON BE., ZHAO M., QIAN MW., BUCALA R., XIN D., MITCHELL RA. Cooperative regulation of non-small cell lung carcinoma angiogenic potential by macrophage migration inhibitory factor and its homolog, D-dopachrome tautomerase. *J Immunol.* 2008 Aug 15;181(4):2330-7.

CUNHA, G. R. et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrine Reviews*, v. 8, n. 3, p. 338–362, 1987.

CUNHA, G. R.; COOKE, P. S.; KURITA, T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Archives of Histology and Cytology*, v. 67, n. 5, p. 417–34, 2004.

CUNHA, G., RICKE, W., THOMSON, A., MARKER, P., & KURITA, T. (2004). Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 92, 221-236.

CUNHA, G. R. Mesenchymal-epithelial interactions: Past, present, and future. *Differentiation*, v. 76, n. 6, p. 578–586, 2008.

DANIELPOUR, D., KADOMATSU K., ANZANO M., SMITH J., SPORN M.; Desenvolvimento e caracterização de linhas celulares epiteliais não tumorigênicas e tumorigênicas da próstata dorsal-lateral de rato. *Câncer Res* 1 de julho de 1994; 54 (13): 3413–3421.

DAZERT, E., & HALL, M. N. (2011). mTOR signaling in disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(6), 644-653.

DE R., SARKAR S., MAZUMDER S., DEBSHARMA S., SIDDIQUI A., SAHA S., BANERJEE C., NAG S., SAHA D., PRAMANIK S., & BANDYOPADHYAY U. (2018). O fator inibidor da migração de macrófagos regula a dinâmica mitocondrial e o crescimento celular de linhas de células cancerígenas humanas por meio da sinalização CD74 – NF-κB. *The Journal of Biological Chemistry*, 293, 19740 - 19760.

DENG, Y., et al. (2019). MIF promotes lung cancer cell migration and invasion through the ERK pathway. *Cancer Letters*, 457, 1-9.

DI CARLO, E., & SORRENTINO, C. The multifaceted role of the stroma in the healthy prostate and prostate cancer. *J Transl Med*, 22, 825 (2024).

FINUCANE O. M., REYNOLDS C. M., MCGILLICUDDY F. C., HARFORD K. A,

MORRISON M, BAUGH J, et al. A deficiência do fator inibitório da migração de macrófagos melhora a resistência à insulina induzida por dieta rica em gordura em camundongos com inflamação adiposa reduzida e esteatose hepática. *PLoS UM*. 2014; 9 :e113369.

FRANCK-LISSBRANT, I., HÄGGSTRÖM, S., DAMBER, J., & BERGH, A. (1998). "Testosterone stimulates angiogenesis and vascular regrowth in the ventral prostate of adult castrated rats." *Endocrinology*, 139(2), 451-6.

GERDES, M. J., LARSEN, M., MCBRIDE, L., DANG, T. D., LU, B., & ROWLEY, D. R. Localization of Transforming Growth Factor- β 1 and Type II Receptor in Developing Normal Human Prostate and Carcinoma Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1998;46(3):379-388.

GROSSMANN, M. E.; HUANG, H.; TINDALL, D. J. Androgen receptor signaling in androgen- refractory prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. v. 93, n. 22, p. 1687-1697, 2001.

GUO, D., GUO, J., YAO, J., JIANG, K., HU, J., WANG, B., LIU, H., LIN, L., SUN, W., & JIANG, X. (2016). D-dopachrome tautomerase is over-expressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and acts cooperatively with macrophage migration inhibitory factor to promote cancer growth. *International Journal of Cancer*, 139.

HAYWARD, S. W.; BASKIN, L. S.; HAUGHNEY, P. C.; FOSTER, B. A.; CUNHA, A. R.; DAHIYA, R.; PRINS, G. S.; CUNHA, G. R. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anatomica*. v.155, n.2, p. 94-103, 1996.

HAYWARD, S. W., & CUNHA, G. R. (2000). *THE PROSTATE: DEVELOPMENT AND PHYSIOLOGY*. *Radiologic Clinics of North America*, 38(1), 1–14. doi:10.1016/s0033-8389(05)70146-9.

IMASATO, Y., ONITA, T., MOUSSA, M., SAKAI, H., CHAN, F., KOROPATNICK, J., CHIN, J., & XUAN, J. (2001). A expressão do gene PSP94 em roedores é mais específica para a próstata dorsolateral e menos sensível à ablação de andrógenos do que a probasina. *Endocrinologia* , 142(5), 2138-46.

KALLURI, R. (2003). "A Biologia da Matriz Extracelular." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(6), 450-461.

KIM B., TILSTAM P., ARNKE K., LENG L., RUHL T., PIECYCHNA M., SCHULTE W., SAULER M., FRUEH F., STORTI G., LINDENBLATT N., GIOVANOLI P., PALLUA N., BERNHAGEN J., & BUCALA R. (2020). Differential regulation of macrophage activation by the MIF cytokine superfamily members MIF and MIF-2 in adipose tissue during endotoxemia. *The FASEB Journal*, 34, 4219 - 4233.

KIM, D. H. et al. (2018). mTOR: a key regulator of cellular homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(1), 21-37.

KINDT, N., PREILLON, J., KALTNER, H., GABIU, H.J., CHEVALIER, D., RODRIGUEZ, A., JOHNSON, B.D., MEGALIZZI, V., DECAESTECKER, C., LAURENT, G., et al. Fator inibitório da migração de macrófagos no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço: estudos clínicos e experimentais. *J Câncer Res Clin Oncol*. 2013; 139 :727–737.

KUMAR, V. L.; MAJUMDER, P. K. Prostate gland: structure, functions and regulation. *International Urology and Nephrology*. v. 27, n. 3, p. 231-243, 1995.

LABRIE, F.; LUU-THE, V.; LIN, S. X.; SIMARD, J.; LABRIE, C.; EL-ALFY, M.; PELLETIER, G.; BELANGER, A. Intracrinology: role of the family of 17 beta hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *Journal of Molecular Endocrinology*. v. 25, n. 1, p. 1-16, 2000.

LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. v. 40, n. 3, p. 565-575, viii-ix, 2011.

LENG L., METZ C.N., FANG Y., JING X., DONNELLY S., BAUGH., DELOHERY T., CHEN Y., MITCHELL R.A., BUCALA R. MIF Signal Transduction Initiated by Binding to CD74 . *J Exp Med* 2 June 2003; 197 (11): 1467–1476.

LOWSLEY O.S., The development of the human prostate gland with reference to the development of other structures at the neck of the urinary bladder. *Am J Anat*. 1912;13:299-349.

LUE, H., THIELE, M., FRANZ, J. et al. O fator inibitório da migração de macrófagos

(MIF) promove a sobrevivência celular pela ativação da via Akt e o papel do CSN5/JAB1 no controle da atividade autócrina do MIF. *Oncogene*, 26, 5046–5059 (2007).

MATEJUK, AGATA & BENEDEK, GIL & BUCALA, RICHARD & MATEJUK, SZYMON & OFFNER, HALINA & VANDENBARK, ARTHUR. (2024). MIF contribution to progressive brain diseases. *Journal of Neuroinflammation*. 21. 10.1186/s12974-023-02993-6.

MAUNEY, J.; OLSEN, B. R.; VOLLOCH, V. Matrix remodeling stem cell recruitment: A novel in vitro model for homing of human bone marrow stromal cells to the site of injury shows crucial role of extracellular collagen matrix. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, v. 29, n. 8, p. 657–663, 2010.

MCNEAL, J. E. Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol*. v. 15, n. 1, p. 340- 345, 1978.

MERK, M., MITCHELL, R., ENDRES, S., & BUCALA, R. (2012). D-dopachrome tautomerase (D-DT or MIF-2): doubling the MIF cytokine family. *Cytokine*, 59(1), 10-7.

MEYER-SIEGLER, K. L.; ICZKOWSKI, K. A.; VERA, P. L. Further evidence for increased macrophage migration inhibitory factor expression in prostate cancer. *BMC Cancer*. v. 5, n. 1, p. 73, 2005.

MEYER-SIEGLER, K. L.; FATTOR, R. A.; HUDSON, P. B. Expression of macrophage migration inhibitory factor in the human prostate. *Diagn Mol Pathol*. v. 7, n. 1, p. 44-50, 1998.

MEYER-SIEGLER, K. L.; ICZKOWSKI, K. A.; LENG, L.; BUCALA, R.; VERA, P. L. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU145 prostate cancer cells. *J. Immunol*. v. 177, n. 1, p. 8730–8739, 2006.

MEYER-SIEGLER, K. L.; PERRY, B. H. Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology*. v. 48, n. 3, p. 448-452, 1996.

MEZA-ROMERO, R., BENEDEK, G., JORDAN, K., LENG, L., PANTOURLIS, G., LOLIS, E., BUCALA, R., & VANDENBARK, A. (2016). Modelagem de interações compartilhadas e distintas entre MIF e seu homólogo D-DT com seu receptor comum CD74. *Citocina*, 88, 62-70.

MILLICENT V., KOONG A. C., RENDON B. E., ZUNDEL W., MITCHELL R. A.;
Amplificação de respostas hipóxicas tumorais por estabilização de fator induzido por hipóxia dependente de fator inibidor de migração de macrófagos. *Câncer Res* 1º de janeiro de 2007; 67 (1): 186–193.

MITCHELL R.A., METZ, C.N., PENG, T., BUCALA, R. Sustained Mitogen- activated Protein Kinase (MAPK) and Cytoplasmatic Phospholipase A2 Activation by Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). *J Biol Chem, United Statesav.* 274, nº 25, Jun, 1999.

PENTICUFF J. C.; WOOLBRIGHT, B. L.; SIELECKI, T. M.; WEIR, S. J.; TAYLOR, J. A.
MIF family proteins in genitourinary cancer: tumorigenic roles and therapeutic potential. *Nat Rev Urol.* v. 16, n. 5, p. 318-328, 2019.

PRINS, G., BIRCH, L., COUSE, J., CHOI, I., KATZENELLENBOGEN, B., & KORACH, K. (2001). A impressão de estrogênio da próstata em desenvolvimento é mediada pelo receptor alfa de estrogênio estromal: estudos com camundongos alphaERKO e betaERKO. *Cancer Research*, 61 (16), 6089-97.

PRINS, G. S.; LINDGREN, M. Accessory Sex Glands in the Male. In Plant, T. M. & Zeleznik, A. J. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 4. ed. New York: Elsevier, 2015. p. 773-804.

RATO, L. et al. Testosterone deficiency induced by progressive stages of diabetes mellitus impairs glucose metabolism and favors glycogenesis in mature rat Sertoli cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 66, p. 1–10, 2015.

RIBEIRO, D. L.; TABOGA, S. R.; GÓES, R. M. Diabetes induces stromal remodelling and increase in chondroitin sulphate proteoglycans of the rat ventral prostate. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 90, n. 4, p. 400–411, 2009.

RISBRIDGER, G.; TAYLOR, R. Physiology of the Male Accessory Sex Structures: The Prostate Gland, Seminal Vesicles, and Bulbourethral Glands. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, 3rd, cap 23, 2006.

SAXTON, R. A., & SABATINI, D. M. (2017). mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, 169(2), 361-371.

SHI X., COMPRIMENTO EU., WANG T., WANG C., VOCÊ X., EU E., MCDONALD C.,

CHEN Z., MURPHY-O TJ, LOLIS E. e outros. (2006). CD44 é o componente de sinalização do complexo fator inibidor da migração de macrófagos-receptor CD74. *Imunidade* 25, 595-606.

SHIMIZU, K., et al. (2010). "MIF regulates the survival of macrophages." **Journal of Immunology**, 185(7), 4395-4403.

SHUM, W. W.; DA SILVA, N.; MCKEE, M.; SMITH, P. J.; BROWN, D.; BRETON, S.
Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell*. v. 135, n. 6, p. 1108-1117, 2008

SIMPSON, K., TEMPLETON, D., & CROSS, J. (2013). Abstract 2812: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates monocytic MDSC abundance to contribute to tumor growth and metastasis. *Cancer Research*, 73, 2812-2812.

SUGIMURA, Y.; CUNHA, G. R.; DONJACOUR, A. A. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biology of Reproduction*. v. 34, n. 5, p. 961-971, 1986.

SZCZEŚNIAK P., HENKE T., FRÖHLICH S., PLESSMANN U., URLAUB H., LENG L., BUCALA R., GROSSE R., MEINHARDT A., KLUG J.; O MIF extracelular, mas não o seu homólogo D-DT, promove a motilidade dos fibroblastos independentemente do seu complexo receptor CD74/CD44. *J Cell Sci* de 2021; 134 (3).

TABOGA, S. R., VILAMAIOR, P. S. L., & GÓES, R. M. (2009). Modulação androgênica e estrogênica na próstata: uma abordagem em modelos experimentais de roedores com enfoque na biologia estrutural. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 53(8), 946–955.

TARNOWSKI .M., GRYMULA. K., LIU. R., TARNOWSKA. J., DRUKALA. J., RATAJCZAK. J. MITCHELL. R. A., RATAJCZAK. M. Z., KUCIA. M. Macrophage migration inhibitory factor is secreted by rhabdomyosarcoma cells, modulates tumor metastasis by binding to CXCR4 and CXCR7 receptors and inhibits recruitment of câncer-associated fibroblasts. *Mol Cancer Res*, v. 8, p. 1328-1343, 2010.

TOIVANEN, R.; MOHAN, A.; SHEN, M. M. Basal Progenitors Contribute to Repair of the Prostate Epithelium Following Induced Luminal Anoikis. *Stem Cell Reports*. v. 6, n. 5, p. 660- 667, 2016.

TOMASEK J. J., GABBIANI G., HINZ B., CHAPONNIER C., BROWN R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 May;3(5):349-63.

TUXHORN, J. A. et al. Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer Research*, v. 62, n. 11, p. 3298– 3307, 2002.

VALDEZ C.N., SÁNCHEZ-ZUNO G.A., BUCALA R., TRAN T.T., Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF) e Tautomerase D-Dopacromo (DDT): Caminhos para a Tumorigênese e Oportunidades Terapêuticas, *International Journal of Molecular Sciences*, 10.3390/ij.

VERZE, P.; CAI, T.; LORENZETTI, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nature Review Urology*. v. 13, n. 7, p. 379-386, 2016.

VILAMAIOR, P. S. L.; TABOGA, S. R.; CARVALHO, H. F. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: A stereological and morphometrical study. *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, v. 288, n. 8, p. 885–892, 2006.

WANG, J.; ZHU, H. H.; CHU, M.; LIU, Y.; ZHANG, C.; LIU, G.; YANG, X.; YANG, R.; GAO, W. Q. Symmetrical and asymmetrical division analysis provides evidence for a hierarchy of prostate epithelial cell lineages. *Nature Communications*. v. 5, p. 4758, 2014.

WEIBEL, E. R. Selection of the best method in stereology. *Journal of Microscopy*. v. 100, n. 3, p. 261- 269, 1974.

YAMAGUCHI, E., NISHIHARA, J., SHIMIZU, T., et al., 2000. Fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) na asma brônquica . *Clin Exp Alergia* , **30** (9): 1244-1249. 10.1046/j.1365- 2222.2000.00888.

YUAN, X., BALK, S.P. Mechanisms mediating androgen receptor reactivation after castration. *Urol Oncol.* 2009 Jan-Feb;27(1):36-41. doi: 10.1016/j.urolonc.2008.03.021. PMID: 19111796; PMCID: PMC3245883;

ZANG, T.; TAPLINA, M. E.; TAMAE, D.; XIE, W.; MESAROS C.; ZHANG, Z.; BUBLEY, G.; MONTGOMERY, B.; BALK, S. P.; MOSTAGHEL, E. A.; BLAIR, I. A.; PENNING, T. M. Testicular vs adrenal sources of hydroxy-androgens in prostate cancer. *EndocrineRelated*

Cancer. v. 24, n. 8, p. 393-404, 2017.

ZHANG, Y., LIU, Z., WANG, K., LU, S., FAN, S., XU, L., & CAI, B. Macrophage migration inhibitory factor regulates joint capsule fibrosis by promoting TGF- β 1 production in fibroblasts. *Int J Biol Sci*, 2021 Apr 29;17(7):1837-1850.