

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

LAURA EDUARDA DINATO SUDÁRIO

**FATOR DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS (MIF) E SUA FUNÇÃO
NO DESENVOLVIMENTO DA PRÓSTATA LATERAL DE CAMUNDONGOS**

**UBERLÂNDIA - MG
NOVEMBRO DE 2024**

LAURA EDUARDA DINATO SUDÁRIO

**FATOR DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS (MIF) E SUA FUNÇÃO
NO DESENVOLVIMENTO DA PRÓSTATA LATERAL DE CAMUNDONGOS**

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Biotecnologia.

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

**UBERLÂNDIA – MG
NOVEMBRO DE 2024**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Karla e Luiz Eduardo, por sempre acreditarem no meu potencial e me incentivarem a seguir em frente. Chegar até aqui com certeza não teria sido possível sem vocês.

Gostaria de agradecer também a minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Daniele Lisboa Ribeiro, que me acolheu logo no início da minha jornada na ciência e me ajudou a evoluir não só no âmbito acadêmico, mas também no pessoal. Muito obrigada pela paciência, por todo o conhecimento compartilhado e por ter despertado em mim um gosto pela pesquisa que eu nem imaginava que tinha.

Aos meus companheiros de laboratório pós-graduandos Luiz Felipe e Júlia, agradeço por estarem comigo nessa jornada, ensinando as rotinas e protocolos de laboratório e permitindo que eu desenvolvesse minha parte da melhor forma.

À Marina, uma amiga que o laboratório me deu, agradeço pela parceria, pelas risadas e pelos bons momentos que compartilhamos desde que iniciamos nossas trajetórias interligadas pela Biotecnologia e pela pesquisa.

Aos demais amigos da universidade e de fora dela que estiveram presentes em todo o processo, escutando minhas reclamações e deixando tudo mais leve, me dando forças para seguir até o final.

Aos professores que, de alguma forma impactaram na minha formação acadêmica, obrigada pelo esforço e pelos ensinamentos passados.

À Prof^a Dr^a. Juliana Gonzaga de Oliveira e ao Dr. Marcos Paulo Oliveira Almeida, obrigada por aceitarem o convite para serem parte da banca avaliadora desse trabalho, trazendo valiosas contribuições ao estudo.

RESUMO

Em roedores, a organogênese prostática possui importantes etapas proliferativas e apoptóticas pós-natais, culminando com a formação de uma glândula com lobos bem definidos e características morfológicas diferenciadas. O fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) é uma citocina pró-inflamatória, relacionada com diversas vias de sinalização proliferativas, expressa no epitélio glandular prostático e com uma superexpressão em condições patológicas. No entanto, sua função no desenvolvimento e funcionalidade da glândula ainda não foi elucidada. Este trabalho visou aprofundar a compreensão do papel do MIF no desenvolvimento pós-natal da próstata lateral de camundongos pré-púberes e púberes e entender se sua ausência exerce impacto na glândula. Para isso, foram usados camundongos C57BL/6 e MIF *knockout* nas idades de 30 e 60 dias. O sangue dos animais foi coletado para quantificação de testosterona por ELISA. Cortes histológicos foram usados para estudo geral do lobo lateral (coloração HE), de fibras colágenas (coloração Picrosirius-Hematoxilina) e imunohistoquímica para proliferação celular, fibroblastos e células musculares lisas. Parte das amostras foi congelada para extração de proteínas e mensuração dos níveis de caspase-3. Os dados foram analisados estatisticamente pelo software BioEstat. Os resultados mostram uma redução da proliferação celular epitelial em camundongos pré-púberes MIF *knockout* em relação ao controle, bem como aumento na proliferação estromal aos 60 dias. A apoptose nesses indivíduos é maior ao longo do desenvolvimento e na fase púbere. A frequência de fibroblastos não sofreu alterações significativas, mas a quantidade de colágeno em indivíduos *knockout* de 30 dias é menor em comparação com os selvagens. Ademais, esses animais apresentaram maior redução na frequência de células musculares lisas ao longo do desenvolvimento. Os níveis de testosterona foram maiores em MIF^{-/-} na fase pré-púbere. Esses dados são refletidos na estereologia, na qual os animais MIF^{-/-} tiveram redução maior que a esperada no epitélio e menor aumento no lúmen ao longo do desenvolvimento pré-púbere para púbere e não apresentaram as diminuições esperadas em estroma muscular e não-muscular. Ainda, em comparação ao controle de mesma idade, MIF^{-/-} 30 dias tem menor área estromal. Desse modo, pudemos concluir que a sinalização MIF tem relevância para o correto desenvolvimento da próstata e que sua ausência causa impacto no lobo lateral prostático por meio da redução de componentes importantes de estrutura e contratilidade.

Palavras – chave: MIF. *Knockout*. Próstata Lateral. Desenvolvimento. Proliferação celular

ABSTRACT

In rodents, prostate organogenesis has important proliferative and apoptotic postnatal stages, culminating in the formation of a gland with well-defined lobes and differentiated morphological characteristics. The macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a pro-inflammatory cytokine, related to several proliferative signaling pathways, expressed in the prostate glandular epithelium and overexpressed in pathological conditions. However, its function in the development and function of the gland has not yet been elucidated. This study aimed to deepen the understanding of the role of MIF in the postnatal development of the lateral prostate of prepubertal and pubertal mice and to understand whether its absence has an impact on the gland. For this, C57BL/16 and MIF knockout mice were used at the ages of 30 and 60 days. The animals' blood was collected for testosterone quantification by ELISA. Histological sections were used for general study of the lateral lobe (HE staining), collagen fibers (Picrosirius-Hematoxylin staining) and immunohistochemistry for cell proliferation, fibroblasts, and smooth muscle cells. Part of the samples was frozen for protein extraction and measurement of caspase-3 levels. A reduction in epithelial cell proliferation was observed in prepubertal MIF knockout mice compared to the control, as well as an increase in stromal proliferation at 60 days. Apoptosis in these individuals is higher throughout development and in the pubertal phase. The frequency of fibroblasts did not undergo significant changes, but the amount of collagen in MIF^{-/-}30 days is lower compared to wild-type. In addition, these animals showed a greater reduction in the frequency of smooth muscle cells throughout development. Testosterone levels were increased in MIF^{-/-} of prepubertal age. These data are reflected in stereology, in which MIF^{-/-} animals had a reduction in the epithelium greater than expected and a smaller increase in the lumen and did not present the expected decreases in muscular and non-muscular throughout prepubertal to pubertal development. In addition, when compared to wild mice of the same age, MIF^{-/-} 30 days had reduced stromal area. Thus, we can conclude that MIF signaling is relevant for the correct development of the prostate and that its absence impacts the lateral prostate lobe through the reduction of important components of structure and contractility.

Key words: MIF. Knockout. Lateral prostate. Development. Cell proliferation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
1.1	Estrutura da próstata em diferentes espécies.....	8
1.2	Desenvolvimento prostático	10
1.3	Fisiologia da próstata.....	11
1.4	Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF).....	12
1.5	Relação entre o MIF e a próstata	13
1.6	Justificativa	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral:	15
2.2	Objetivos Específicos:	15
3	METODOLOGIA.....	15
3.1	Animais	15
3.2	Análise morfológica	16
3.3	Imunohistoquímica	16
3.4	Avaliação de apoptose	17
3.5	Quantificação de testosterona por ELISA.....	17
3.6	Análise estatística	17
4	RESULTADOS	19
4.1	Dados biométricos.....	19
4.2	Estereologia da próstata lateral.....	20
4.3	Quantificação de colágeno.....	20
4.4	Análise de proliferação celular	20
4.5	Quantificação de fibroblastos	24
4.6	Quantificação das células musculares lisas	24
4.7	Avaliação de apoptose	27
4.8	Quantificação da testosterona.....	27
5	DISCUSSÃO	28
6	CONCLUSÃO	33
7	REFERÊNCIAS.....	34

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Divisão anatômica da próstata humana e de camundongos.	9
Figura 2 - Vias de sinalização do fator de inibição de migração de macrófagos (MIF).....	13
Tabela 1 - Médias do peso corporal, peso prostático e peso relativo da próstata de camundongos selvagens e MIF <i>knockout</i> com 30 (C30 e M30) e 60 dias de vida (C60 e M60).....	19
Figura 3 – Estereologia da próstata lateral de camundongos controle e MIF ^{-/-} em diferentes idades.	21
Figura 4 – Distribuição de colágeno na próstata lateral de camundongos controle e MIF ^{-/-} com 30 e 60 dias de vida.	22
Figura 5 – Proliferação celular na próstata lateral de camundongos controle e MIF ^{-/-} com 30 e 60 dias de vida.	23
Figura 6 – Localização e quantificação de fibroblastos, através da marcação com vimentina, na próstata lateral de camundongos controle e MIF ^{-/-} com 30 e 60 dias de vida.....	25
Figura 7 – Estudo das células musculares lisas na próstata lateral de camundongos controle e MIF ^{-/-} com 30 e 60 dias de vida.	26
Figura 8 - Representação gráfica do conteúdo de caspase-3 ativa, dada por intensidade de fluorescência dividida pela concentração de proteína, na próstata de grupos de camundongos controle e MIF ^{-/-} nas idades de 30 e 60 dias.	27
Figura 9 - Concentração de testosterona no plasma de camundongos controle e MIF ^{-/-} nas idades de 30 e 60 dias.	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AKT** - proteína quinase B
- AP-1** - fator de transcrição ativador da proteína 1
- AR** – Receptor de Andrógenos
- D-DT** - D – Dopacroma Tautomerase
- DHT** - Di-hidrotestosterona
- ELISA** - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
- ERK** - Proteína regulada por sinais extracelulares
- HPB** – Hiperplasia prostática benigna
- JAB1** - proteína 1 de ligação ao domínio de ativação JUN
- MAPK** - proteína quinase ativada por mitógenos
- MIF** - Fator de inibição da migração de macrófagos
- MIF^{-/-}** - MIF *knockout*
- MMP** - Metaloproteinase de matriz
- NFκB** - Fator nuclear kappa B
- PCNA** – Antígeno nuclear de proliferação celular
- PI3K** - quinase fosfatidilinositol 3
- SRC** - proteína tirosina-quinase proto-oncogênica
- TGF-β** - Fator de crescimento transformador beta
- UGS** – seio urogenital

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura da próstata em diferentes espécies

A próstata é uma glândula exócrina do trato genital masculino, encontrada exclusivamente em mamíferos. Localizada abaixo da bexiga urinária e à frente do reto, ela circunda a uretra e aos dois lados de sua base encontram-se as vesículas seminais. Sua principal função é fornecer os íons e proteínas componentes do fluido seminal, responsável por oferecer aos espermatozoides condições para sobrevivência e viabilidade após a ejaculação (Cunha *et al.*, 1987; Ittmann, 2018; Hayward; Cunha, 2000; Price, 1963).

Na espécie humana, a próstata do feto é formada por cinco lobos: anterior, posterior, mediano e dois laterais, que se fundem no desenvolvimento e resultam em um órgão compacto, sem porções distinguíveis. A classificação de McNeal (1988) divide a próstata humana adulta em três grandes regiões distintas histologicamente e biologicamente uma das outras: zona periférica, zona central e zona de transição. Tal separação apresenta relevância clínica, uma vez que cada zona está relacionada a diferentes patologias que podem implicar em um déficit na funcionalidade da glândula. A zona periférica, por exemplo, constitui cerca de 70% da massa prostática e está relacionada com a maioria dos cânceres prostáticos. A zona de transição, que constitui cerca de 5% da próstata, é a região de origem da hiperplasia prostática benigna, condição observada em homens de idade mais avançada, e a zona central representa 25% da massa glandular, mas não se apresenta como sítio de origem de nenhuma dessas condições, podendo ser afetada caso elas estejam em estágios avançados (Cunha *et al.*, 1987; Ittmann, 2018).

Em roedores, a próstata é constituída por quatro lobos bilaterais, cuja nomenclatura tem relação com a posição que ocupam em relação à uretra, sendo designados: anterior (AP), dorsal (DP), lateral (LP) e ventral (VP) (Francis; Swain, 2018). O tecido prostático nesses animais é túbulo-alveolar, composto por diversos ácinos envoltos por epitélio de revestimento e cercados por uma matriz estromal, sendo que cada ácino prostático é envolto por uma única camada de tecido muscular liso e cada lobo apresenta estrutura glandular própria (Jesik; Holland; Lee, 1982). O lobo lateral, especificamente, é caracterizado por uma superfície luminal plana, ácinos maiores revestidos por células epiteliais cuboides e colunares com invaginações poucas ou moderadas, células secretoras com lúmen pequeno e de citoplasma eosinofílico, circundados por uma fina camada de estroma fibromuscular (Ittmann, 2018; Ginja *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2016).

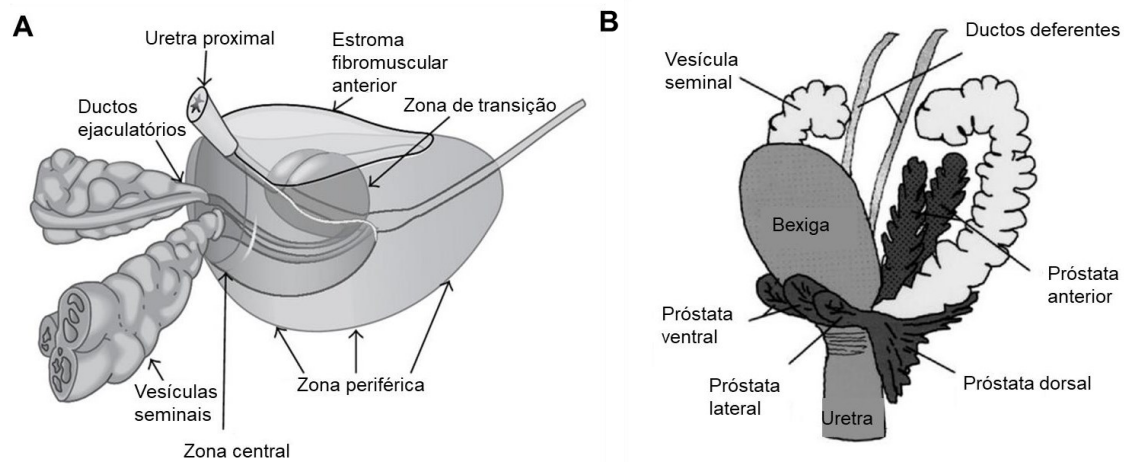


Figura 1 - Divisão anatômica da próstata humana e de camundongos. (A) Representação esquemática da próstata humana de acordo com a classificação de McNeal (1988). (B) Representação esquemática da próstata de camundongos contendo os quatro lobos bilaterais. (Imagens adaptadas de Bhavsar; Verma, 2014 e Valkenburg; Williams, 2011, respectivamente)

Apesar de modelos animais, em especial camundongos, serem de grande importância no estudo de patologias prostáticas humanas, como cânceres, devido às diferenças anatômicas e histológicas entre as próstatas dessas espécies, há o questionamento sobre a verdadeira relação entre os lobos prostáticos de camundongos e as zonas da próstata humana em termos de estrutura e funcionalidade na análise da origem, prevenção e tratamento dessas doenças (ITTMANN, 2018; ITTMANN *et al.*, 2013; SHAPPELL *et al.*, 2004). A partir disso, diversos estudos foram realizados buscando tais similaridades. Berquin *et al.* (2005) demonstrou que o padrão de expressão gênica no lobo dorsolateral de camundongos, junção dos lobos dorsal e lateral, se aproxima do encontrado na zona periférica da próstata humana. Posteriormente, Crowley *et al.* (2020) verificou, por meio de um atlas de células únicas do epitélio da próstata de camundongos adultos, que, apesar de haver poucos estudos sobre tumores prostáticos utilizando especificamente o lobo lateral, por ter tamanho reduzido e geralmente ser analisado junto com lobo dorsal, esse é o lobo que apresenta maior semelhança histológica com a zona periférica humana, relacionada com a maior parte dos cânceres prostáticos, além de apresentar diferenças anatômicas e moleculares significativas em relação ao lobo dorsal.

1.2 Desenvolvimento prostático

Nas espécies de mamíferos já estudadas, apesar de algumas diferenças específicas no processo, o desenvolvimento prostático é bastante semelhante, tendo início a partir de brotos epiteliais emergidos do seio urogenital (UGS) e com importantes eventos pós-natais. A princípio ocorre o pré-brotamento do UGS, seguido pelo brotamento do epitélio prostático a partir do epitélio do seio urogenital (UGE), com subsequente alongamento e ramificação dos brotos, canalização dos cordões epiteliais, além da diferenciação de células epiteliais basais e luminais e da citodiferenciação secretora. Neste último estágio, a diferenciação das células epiteliais basais e das luminais colunares ocorre concomitantemente à diferenciação do mesênquima em fibroblastos e músculo liso (Cunha *et al.* 2004b; Cunha *et al.* 2018). Todos esses processos levam à formação da glândula madura e estão relacionados a diversos genes e vias de sinalização, tais como: a via de sinalização do receptor de andrógenos (AR), ativa em todos os momentos da organogênese prostática; a proteína NKX3.1, regulada pela sinalização via Wnt; os fatores de crescimento de fibroblastos, relacionados com o brotamento e ramificação; os sítios de integração relacionados ao gene *Wingless*, agonistas do Wnt; genes *homeobox*, cujo efeito é favorável à ramificação; proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), também envolvidas no processo de ramificação, dentre outros (Buskin *et al.* 2021).

Em humanos, a organogênese prostática tem início entre a 8^a e a 10^a semana da gestação, com o pré-brotamento e o brotamento inicial a partir do UGS e é finalizada com eventos de alongamento dos brotos, ramificação e canalização dos ductos da 11^a semana em diante (Cunha *et al.*, 2018). No nascimento, a próstata humana está quase completamente desenvolvida e há uma pausa no crescimento prostático, que é retomado na puberdade, na qual a próstata se desenvolve em uma glândula madura e complexa com a presença de ductos bem definidos. Em camundongos, por outro lado, o desenvolvimento prostático é iniciado no período da gestação, com o pré-brotamento entre 13^o e o 15^o dia e o brotamento inicial entre o 16^o e o 18^o dia pós-concepção. Já as outras fases do desenvolvimento ocorrem do nascimento até a puberdade, com alongamento, ramificação e canalização ductal até o 50^o dia pós-natal, bem como os processos de citodiferenciação epitelial e mesenquimal, de modo que a maturação da glândula é finalizada por volta dos 60 dias de idade (Buskin *et al.*, 2021; Cunha *et al.*, 2004b; Cunha *et al.*, 2018). Em ambos os casos, a próstata passa por um crescimento e maturação mais rápidos quando os níveis de andrógenos circulantes estão mais altos, caracterizando a puberdade (Oliveira *et al.*, 2016).

A glândula adulta é composta por ácinos que são circundados por camadas de músculo liso e fibroblastos, apresentando assim uma porção epitelial associada a uma estromal (Cunha

et al., 2004a). A parte epitelial é subdividida em 2 unidades histológicas bem definidas: basal e secretora, apresentando diversos tipos celulares, dentre os quais destacamos células-tronco, células basais e células colunares secretoras (De Marzo *et al.*, 1998). A porção estromal apresenta funções principais de suporte mecânico para a camada epitelial, bem como modulação da função secretora da glândula, sendo composta majoritariamente por fibras colágenas, fibroblastos e músculo liso. As células musculares lisas são as células estromais mais numerosas da próstata, devido ao seu papel na interação epitélio-estroma, muito importante para o funcionamento epitelial prostático e sua função na expulsão da secreção da glândula na sua fase reprodutiva (Farnsworth, 1999; Zhang *et al.*, 2003).

1.3 Fisiologia da próstata

A próstata é uma glândula altamente andrógeno-dependente tanto em seu desenvolvimento quanto no exercício de suas funções. A ação de andrógenos, por meio de ligação nos receptores de andrógenos (AR), está presente desde a citodiferenciação epitelial prostática durante o desenvolvimento embrionário até a maturação pós-natal da glândula, bem como a manutenção de sua função secretora e diferenciação celular na vida adulta (Arcolino *et al.*, 2010). A testosterona é o principal andrógeno circundante no homem e pode ser convertida em 5-alfa-dihidrotestosterona (DHT), sua forma mais biologicamente ativa, por meio da ação da enzima 5-alfa-redutase. Tanto a testosterona quanto a DHT podem se ligar aos receptores de andrógenos presentes nas células estromais e epiteliais, no entanto, a DHT apresenta maior afinidade e menor dissociação comparada à testosterona, formando uma ligação mais estável com o receptor e, conseqüentemente, apresentando uma ação mais potente (DAVEY; GROSSMANN, 2016).

Em condições normais, na próstata adulta, os receptores de andrógenos, encontrados principalmente nas células epiteliais luminais atuam diretamente no estímulo da diferenciação dessas células e na regulação da expressão de genes e da transcrição de proteínas necessárias para o funcionamento prostático, como o antígeno prostático específico (PSA) (Vickman *et al.*, 2020; Yuan; Balk, 2009). Há também a atuação androgênica indireta na regulação funcional e de crescimento da glândula, dada pelo estímulo da secreção de fatores de crescimento, como: o epidermal, o de queratinócito, o de fibroblastos e o tipo insulina, atuantes no epitélio e no estroma, num processo de interação parácrina denominado interação epitélio-estroma (Taboga; Vilamaior; Góes, 2009).

A interação epitélio-estroma é uma relação recíproca e necessária para o desenvolvimento prostático presente desde o desenvolvimento embrionário até a vida adulta.

No início da organogênese da glândula (a partir do seio urogenital), o mesênquima induz o desenvolvimento e citodiferenciação epitelial, enquanto o epitélio atua na diferenciação celular do mesênquima em células musculares lisas e outros tipos celulares encontrados no estroma. Isso ocorre por meio da ligação de andrógenos nos receptores de andrógenos presentes em ambos os locais (Cunha, 2008). Já na próstata adulta, essa interação continua apresentando grande importância, uma vez que as células estromais são responsáveis pelo crescimento, morte e diferenciação celular no epitélio, além da manutenção da funcionalidade da glândula por meio de mecanismos como a remodelação estromal (Levesque; Nelson, 2018).

Além destes, outros tipos de hormônios, como glicocorticoides, oxitocina, estrogênios e diversos outros também impactam na fisiologia da glândula e, quando em desequilíbrio, podem levar a patologias prostáticas (Cleutjens *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2017).

1.4 Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF)

O fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) é uma proteína homotrimérica que atua como citocina pró-inflamatória e apresenta função imunorreguladora, estando envolvida no recrutamento de leucócitos, proliferação celular, processos inflamatórios e em diversas outras funções (Huleihel *et al.*, 2017; Sumaiya *et al.*, 2022). A princípio, na década de 60, o MIF foi descrito como uma citocina liberada pelos linfócitos T a partir de estímulos de antígenos e seu nome veio de sua função descoberta na época: a inibição da migração aleatória de macrófagos (David, 1966; Bloom; Bennett, 1966). Devido a estudos posteriores, atualmente sabemos que essa proteína pode ser secretada por várias outras células mediante ativação, como as células do sistema imune, as epiteliais e endoteliais, as parenquimatosas e até mesmo as cancerosas (Merk *et al.*, 2012).

O MIF apresenta funções autócrinas e parácrinas e diversos mecanismos de ação. O principal é sua ligação ao receptor individual CD74, podendo também se ligar a complexos de receptores, que correspondem ao CD74 ligado a correceptores como CD44 ou os receptores CXCR (Jankauskas *et al.*, 2019). A partir dessa ligação, ocorre a fosforilação da proteína tirosina-quinase proto-oncogênica (SRC), a qual ativa várias vias de sinalização, como a da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e a da quinase fosfatidilinositol 3 (PI3K), ambas com efeitos anti-apoptóticos e pró-proliferativos. Além disso, a partir da regulação negativa da proteína supressora de tumor (p53), o MIF também exerce os mesmos efeitos. Já na via transcelular, a proteína atravessa a membrana celular e se liga à proteína 1 de ligação ao domínio de ativação JUN (JAB1) de forma a aumentar ou reduzir a sinalização do fator de

transcrição ativador da proteína 1 (AP-1) (Penticuff *et al.*, 2019). Logo, essa citocina é um importante regulador proliferativo e inflamatório, por estar relacionada com vias anti-apoptóticas, pró-proliferativas e pró-inflamatórias.

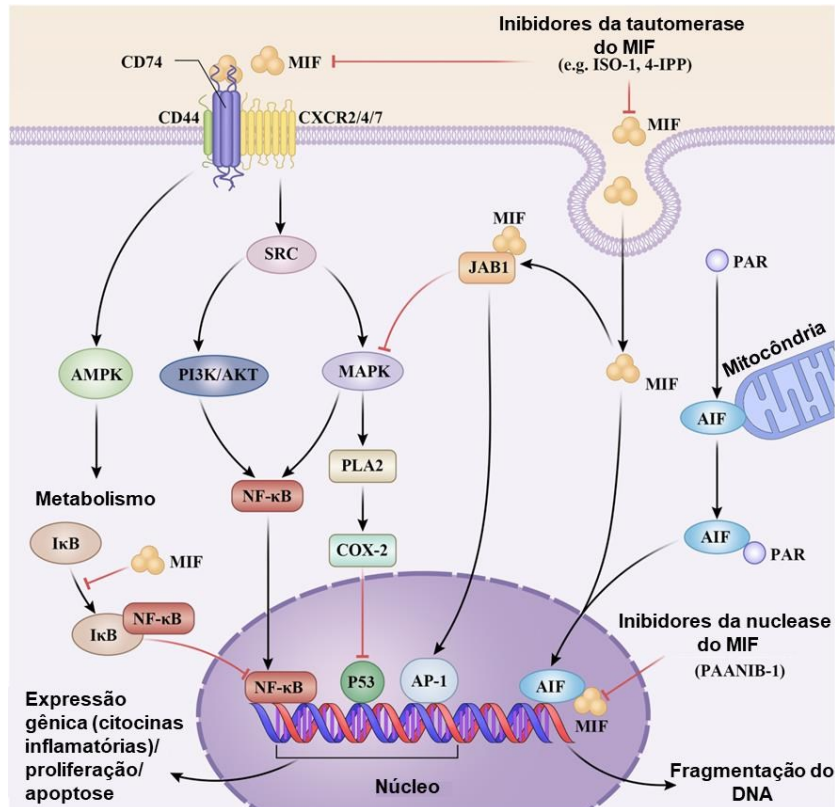


Figura 2 - Vias de sinalização do fator de inibição de migração de macrófagos (MIF). CD44, CD74 e CXCR2/4/7 - receptores de MIF; AMPK - proteína quinase ativada por AMP; IκB - proteína inibidora de κB; NF- κB - fator nuclear Kappa B; SRC - proteína tirosina-quinase proto-oncogênica; PI3K - quinase fosfatidilinositol 3; AKT - proteína quinase B; MAPK - proteína quinase ativada por mitógenos; PLA2 - fosfolipase A2; COX-2 - ciclooxigenase - 2; p53 - proteína supressora de tumor; JAB1 - proteína 1 de ligação ao domínio de ativação JUN; AP-1 - fator de transcrição ativador da proteína 1; PAR - proteína de ligação a Poli-ADP-Ribose; AIF - fator indutor de apoptose (Imagem adaptada de Zhang *et al.*, 2024)

1.5 Relação entre o MIF e a próstata

Meyer-Siegler, Fattor e Hudson (1998) desenvolveram um dos primeiros estudos que comprovou, por imunohistoquímica a expressão do MIF na próstata de forma constitutiva e analisou sua relação com diversas condições patológicas a partir da quantificação realizada por ELISA. Como resultado dessa e de outras pesquisas feitas pelos autores, foi observado que a proteína é expressa pelas células do epitélio glandular prostático e é necessária para as respostas inflamatórias normais na próstata. A sua quantidade varia conforme o estado de desenvolvimento e a existência de alguma patologia, sendo observada uma superexpressão de MIF em condições patológicas relacionadas à proliferação celular exacerbada e inflamação,

como adenocarcinoma prostático metastático e prostatite crônica (Meyer-Siegler; Hudson, 1996; Meyer-Siegler *et al.*, 2005; Meyer-Siegler *et al.*, 2006).

Considerando a expressão aumentada desta proteína em condições patológicas tumorais, o trabalho de Penticuff *et al.* (2019) reuniu vários estudos focados em cânceres geniturinários, incluindo os prostáticos, e apresentou algumas estratégias terapêuticas experimentais cujo alvo é MIF para avaliação de seus efeitos terapêuticos. Dentre elas temos anticorpos anti-MIF, conjugados anticorpo-fármaco contra o receptor CD74, inibidores do sítio tautomerase da proteína, que impedem a ligação MIF-CD74 e várias outras estratégias que visam bloquear os efeitos pró-proliferativos que essa citocina possa ter nessas patologias. Entretanto, o momento e a razão pela qual o MIF pode atuar como alvo terapêutico no câncer de próstata avançado ainda não foi completamente elucidado (Penticuff *et al.*, 2019).

1.6 Justificativa

Diante do exposto, temos que o fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) é comprovadamente expresso na próstata, no entanto, sua função exata e a importância que desempenha no desenvolvimento e funcionamento da glândula ainda não são conhecidos, bem como não foram realizados estudos para explorar as possíveis consequências da ausência de sua expressão na organogênese do sistema reprodutor masculino. Sabendo-se da importância do desenvolvimento pós-natal prostático e do papel da proliferação celular nesse estágio e conhecendo também a influência do MIF em vias de sinalização proliferativas, é possível que sua ausência tenha consequências no desenvolvimento da próstata.

A ênfase no estudo do lobo lateral da próstata de camundongos se apresenta como uma nova visão sobre o desenvolvimento prostático, uma vez que não é o foco da maioria das pesquisas existentes. Mesmo apresentando maiores semelhanças com a zona periférica da próstata humana, a qual está relacionada com grande parte dos cânceres prostáticos, o lobo ventral é o mais estudado em detrimento ao lateral devido a sua mais fácil dissecação. Ademais, como cada lobo possui estrutura glandular própria, com características morfológicas diferenciadas, suas interações com o MIF e consequências de sua ausência podem também ser diferentes, o que evidencia a necessidade de uma análise específica para cada região.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

O trabalho buscou avaliar a contribuição de MIF no desenvolvimento pós-natal da próstata lateral de camundongos pré-púberes e púberes através de modelo *knockout* e entender se a sua ausência traz qualquer impacto para a glândula.

2.2 Objetivos Específicos:

- Estudar a morfologia geral da próstata lateral de camundongos MIF^{-/-} em diferentes fases do desenvolvimento e correlacionar com os níveis de séricos de testosterona;
- Avaliar o papel de MIF na proliferação e morte celular na próstata lateral nessas fases do desenvolvimento;
- Investigar o compartimento estromal (células musculares, fibroblastos e fibras colágenas) na ausência de MIF.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Para a realização deste projeto foram utilizados camundongos machos das linhagens C57BL/6 WT (tipo selvagem) e MIF^{-/-} (knockout), mantidos sob temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclos diários de 12 horas claro/escuro, com livre acesso a água e ração sólida granulada (Purina), na Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU). Os animais foram eutanasiados com 30 e 60 dias de idade, seguindo o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), por overdose de Quetamina e Cloridrato de Xilazina 2% na proporção de 1:1 (0,2 mL/100g) por via i.p. (Fundação Oswaldo Cruz, 2008). Os animais foram pesados e, em seguida, por punção cardíaca, o sangue foi coletado, a próstata retirada e pesada. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFU (protocolo 30/21).

Houve a divisão dos animais em 4 grupos, de 15 animais cada, sendo eles:

- Controle de 30 dias (C30) – Animais C57BL/6 WT; eutanasiados com 30 dias pós-natais;
- MIF-*Knockout* de 30 dias (M30) – Animais C57BL/6 sem expressão de MIF que foram eutanasiados com 30 dias pós-natais;
- Controle de 60 dias (C60) – Animais C57BL/6 WT; eutanasiados com 60 dias pós-natais;

- MIF-*Knockout* de 60 dias (M60) – Animais C57BL/6 sem expressão de MIF; eutanasiados com 60 dias pós-natais.

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, 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 do lobo lateral. Foram adquiridas imagens dos cortes histológicos por meio da digitalização utilizando o Scanner de lâminas com *software* Aperio ImageScope 12.4.6 (Leica Biosystems®) e foi feita estereologia para avaliação da frequência relativa do epitélio, lúmen e estroma da próstata usando o método Weibel de contagem de pontos (Weibel, 1974). Tal método 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 tocou o epitélio, lúmen ou estroma foi contado e os dados foram expressos como uma porcentagem da área total (frequência relativa). Esta análise histológica foi realizada na próstata de cinco 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 pelo mesmo método de contagem de pontos utilizado para a estereologia, a partir do *software* IMAGE J.

3.3 Imunohistoquímica

Cortes histológicos em parafina contendo o lobo lateral foram usados para os ensaios imunológicos. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato de sódio pH 6,0 a 90°C por 20 minutos. Em seguida, os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio 3% em solução de metanol para bloquear a peroxidase endógena. Para bloqueio de interações proteicas inespecíficas, foram incubados com albumina de soro bovino (BSA) 5% diluída em tampão Tris salino com Tween 20 (TBST) por 1 hora. Em seguida, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários: α -actina de músculo liso de

camundongo, vimentina ou antígeno de proliferação nuclear (PCNA) de camundongo, na diluição de 1:100 em 1% BSA, *overnight*. Os complexos antígeno-anticorpo foram detectados pelo sistema Polímero de camundongo/ coelho (Biocare®) seguido de reação/coloração DAB (Biocare®) e contra- coloração de hematoxilina (por 4 segundos). Os cortes histológicos foram digitalizados da mesma forma usada para as lâminas de H&E e capturados com ampliação de 40X. 15 áreas de cada corte histológico foram analisadas, 5 animais/grupo. A frequência relativa de células musculares lisas foi determinada usando o método de Weibel descrito anteriormente (WEIBEL, 1974). As células positivas para PCNA foram contadas visualmente com ampliação de 40X. O índice de proliferação foi calculado como o número de núcleos positivos para PCNA dividido pelo total de núcleos celulares e expresso como porcentagem (frequência relativa de células positivas para PCNA).

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, amostras de próstatas foram homogeneizadas e lisadas em tampão RIPA por 30 minutos e centrifugadas a 14000 rpm para coleta do sobrenadante proteico. O conteúdo de caspase-3 foi mensurado com uso do reagente ZDEVD (substrato da caspase-3 ativa) segundo recomendações do fabricante e expresso como 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 amostra foi representada por um pool de 3 próstatas, já no de 60 dias, 1 próstata = 1 amostra.

3.5 Quantificação de testosterona por ELISA

A dosagem de testosterona foi realizada com o kit *Testosterone ELISA* (Cayman® 582701). O experimento foi realizado com amostras de plasma de camundongos de todos os grupos estudados. Os níveis de testosterona foram quantificados por ensaios de ELISA competitivo seguindo as instruções do fabricante. A sensibilidade do teste é de 5,67 pg/ml. Quatro animais por grupo foram usados para esta quantificação e as amostras foram lidas em triplicata.

3.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o *software* BioEstat. A distribuição

dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Em situações de distribuição normal dos valores, as diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste ANOVA, com pós-testes Bonferroni e Tukey, já nos casos de distribuição não-normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. As comparações foram feitas entre controle e MIF^{-/-} de cada idade e entre as diferentes idades de um mesmo grupo. Foi considerado $p < 0,05$ para diferenças estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Dados biométricos

As análises mostraram que na passagem da fase pré-púbere (30 dias) para a púbere (60 dias), os animais do grupo controle apresentaram um aumento de 57% no peso corporal. Os indivíduos MIF^{-/-}, por outro lado, tiveram um acréscimo de apenas 36% durante seu desenvolvimento. Além disso, houve uma redução de aproximadamente 9% no peso corporal de animais MIF *knockout* de 60 dias (M60) em relação aos indivíduos selvagens da mesma idade (C60).

Em relação ao peso prostático, foi observado um aumento de 69% nas próstatas do grupo MIF^{-/-} de 30 dias (M30) quando comparados com o controle da mesma faixa etária (C30) e, ao analisar a diferença entre idades, apesar de ser esperado um aumento de quase 200% no peso da glândula ao longo do desenvolvimento, nos camundongos MIF *knockout* esse ganho foi desacelerado, sendo de apenas 54%, devido à antecipação do ganho de volume na idade pré-púbere.

O peso relativo da próstata (próstata /corpo) também apresentou diferenças entre idades e entre grupos. Notou-se um aumento de 57% do peso relativo de M30 em contraste com C30, o que condiz com os valores de peso prostático apresentados para esses grupos. Foi observado também que dos 30 aos 60 dias de idade era esperado um aumento de 93% no peso relativo, no entanto, esse acréscimo não foi encontrado em MIF^{-/-}, isso é decorrente da desproporção vista entre o crescimento da próstata e do corpo.

Tabela 1 - Médias do peso corporal, peso prostático e peso relativo da próstata de camundongos selvagens e MIF *knockout* com 30 (C30 e M30) e 60 dias de vida (C60 e M60)

Grupos	Peso corporal (g)	Peso da próstata (g)	Peso relativo (g)
C30	16,259 ± 1,28	0,023 ± 0,0065	0,0014 ± 0,0004
M30	17,123 ± 4,44	0,039 ± 0,0153 *	0,0022 ± 0,0004 *
C60	25,608 ± 1,26 #	0,068 ± 0,0147 #	0,0027 ± 0,0007 #
M60	23,335 ± 1,85 *#	0,060 ± 0,0162 #	0,0026 ± 0,0007

Os dados representam média ± desvio padrão da média. Teste ANOVA seguido de teste Bonferroni com p<0,05 indicando diferença significativa entre os grupos (*) e entre idades do mesmo grupo (#)

4.2 Estereologia da próstata lateral

Foram analisadas as frequências relativas de epitélio, lúmen, estroma muscular e estroma não-muscular da próstata lateral em animais com e sem MIF em diferentes fases do desenvolvimento. Entre a fase pré-púbere e a púbere, é esperada uma diminuição de 27% no epitélio e uma ampliação de mais de 100% no lúmen (Figura 3). Entretanto, nos grupos MIF *knockout* foram observadas uma redução maior do epitélio, de 42%, e um aumento inferior ao esperado no lúmen, de 53%. Comparando com o grupo controle de cada idade, não há diferença estatística (Figura 3).

Em se tratando do estroma muscular e estroma não-muscular, diminuições de 37,27% e 32,33%, respectivamente, foram vistas de C30 para C60, no entanto, não houve diferenças significativas para esses componentes entre essas idades do grupo MIF^{-/-}. Todavia, notamos que os animais de M30 redução significativa no estroma não-muscular se comparados com C30 (Figura 3).

4.3 Quantificação de colágeno

A partir da quantificação de fibras colágenas na próstata lateral foi observado que, no caso das alterações ao longo do desenvolvimento, tanto os animais controle quanto os MIF *knockout* apresentaram reduções significativas, porém semelhantes, sendo de cerca de 42% (Figura 4). Na análise entre grupos controle e *knockout*, por outro lado, notamos que indivíduos de M30 já apresentam seu conteúdo de colágeno reduzido em 22% em relação a C30 (Figura 4).

4.4 Análise de proliferação celular

Foi realizado ensaio imunohistoquímico para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) a fim de avaliar as diferenças no epitélio e no estroma do lobo lateral prostático entre os grupos. No epitélio, era esperada uma redução de 16,13% na proliferação celular de 30 para 60 dias de idade, que não foi observada entre os animais MIF *knockout*. Em contrapartida, notamos que em M30 a proliferação já estava 16% reduzida em relação a C30, antecipando um resultado que seria encontrado somente na fase púbere no controle (Figura 5).

Por outro lado, no estroma encontramos que os animais MIF^{-/-} de 60 dias apresentaram 17% mais proliferação celular do que os indivíduos controle de mesma idade (Figura 5).

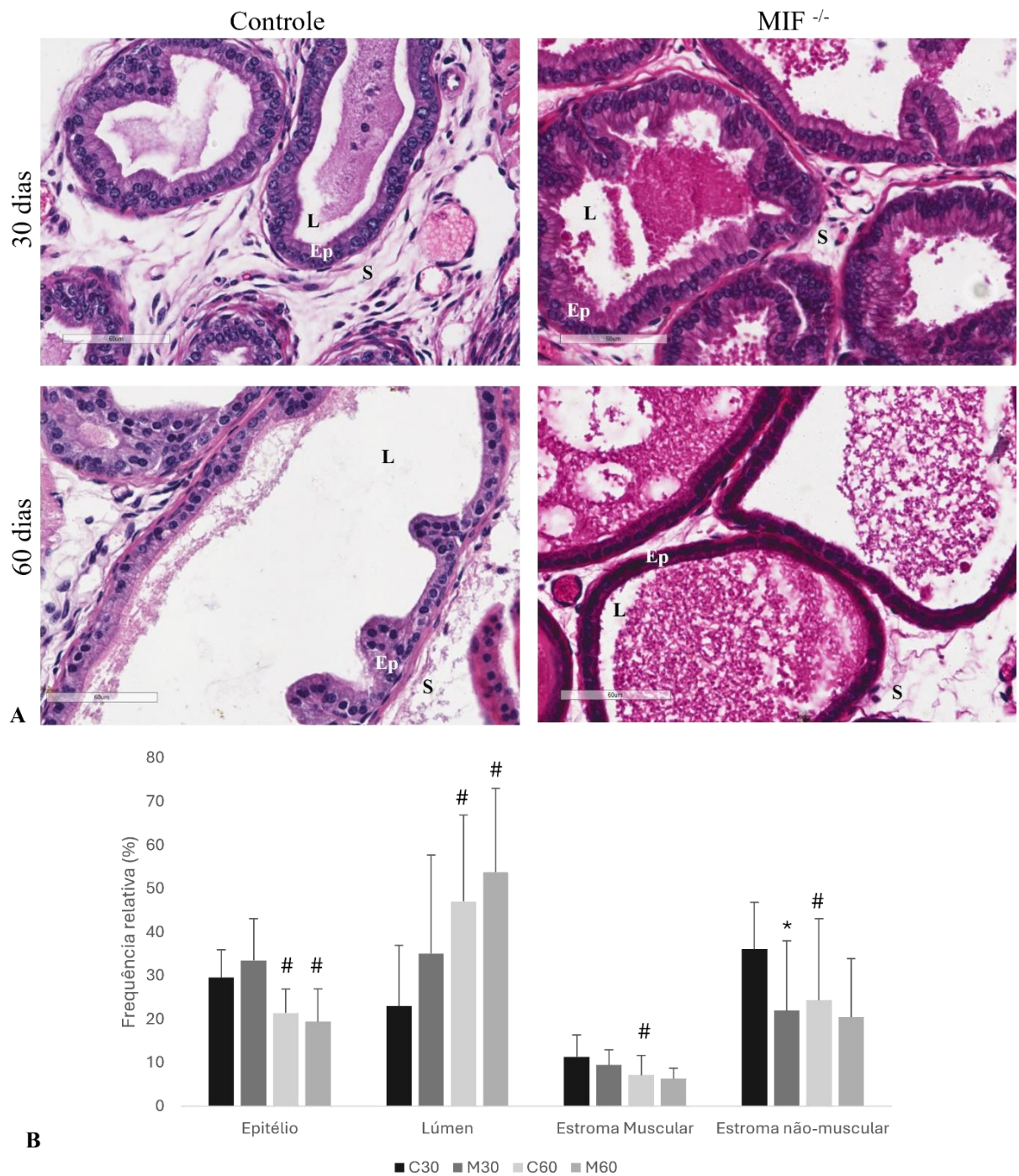


Figura 3 – Estereologia da próstata lateral de camundongos controle e MIF^{-/-} em diferentes idades. (A) Cortes histológicos da próstata lateral de camundongos de grupos controle e MIF *knockout* corados com Hematoxilina-Eosina (H&E). Epitélio (Ep), lúmen (L) e estroma (S). (B) Representa o gráfica da frequência relativa dos diferentes componentes teciduais na próstata lateral de camundongos controle e MIF^{-/-} nas idades de 30 e 60 dias. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. *: diferença estatística entre grupos controle e *knockout*; #: diferença estatística entre idades do mesmo grupo ($p < 0.05$)

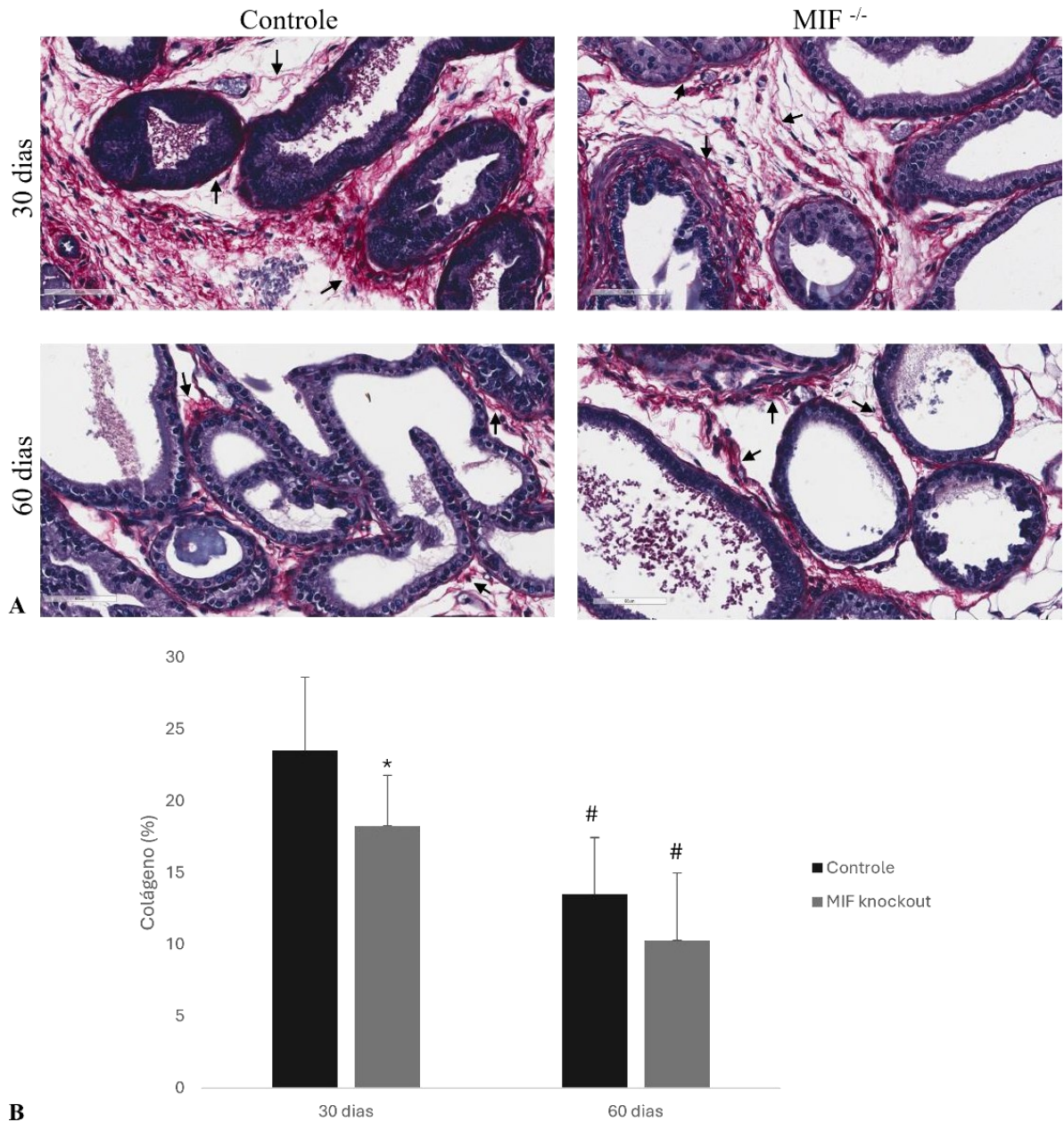


Figura 4 – Distribuição de colágeno na próstata lateral de camundongos controle e MIF^{-/-} com 30 e 60 dias de vida. (A) Cortes histológicos da próstata lateral de camundongos de grupos controle e MIF *knockout* corados com Picrosirius-Hematoxilina. As fibras colágenas estão representadas em rosa/magenta (setas). (B) Representação gráfica da frequência relativa de fibras colágenas na próstata lateral. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. *: diferença estatística significativa entre grupos controle e *knockout*; #: diferença estatística entre idades do mesmo grupo ($p < 0.05$).

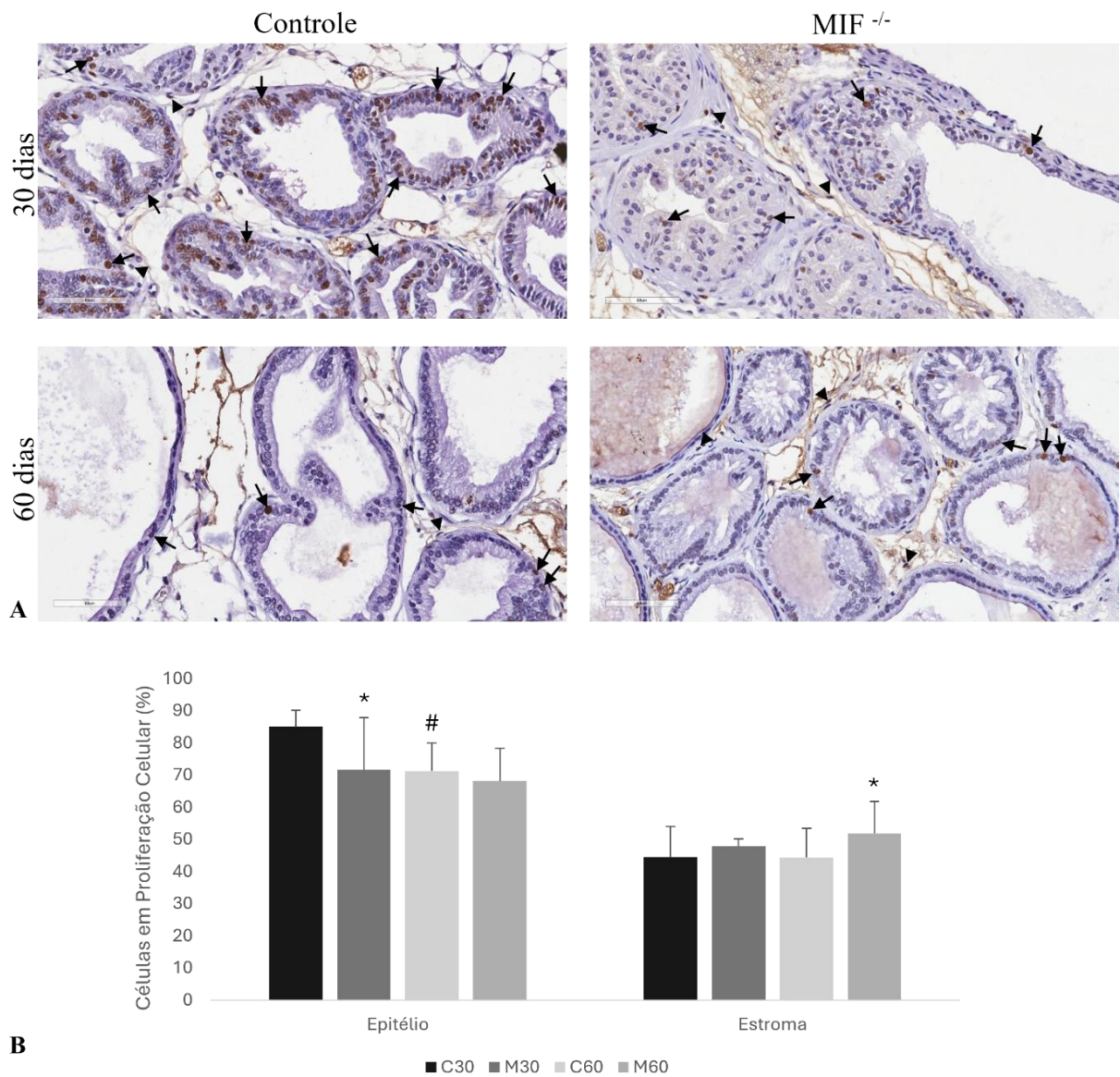


Figura 5 – Proliferação celular na próstata lateral de camundongos controle e MIF^{-/-} com 30 e 60 dias de vida. (A) Cortes histológicos imuno-marcados para PCNA revelam a distribuição de células em proliferação no epitélio (setas) e no estroma (cabeças de seta). (B) Representação gráfica da frequência relativa de células em proliferação da próstata lateral de camundongos. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão. *: diferença estatística entre grupos controle e *knockout*; #: diferença estatística entre idades do mesmo grupo ($p < 0.05$).

4.5 Quantificação de fibroblastos

Foi realizado também ensaio imunohistoquímico para quantificação de fibroblastos, através da marcação com vimentina. Não foram observadas diferenças significativas na frequência relativa de fibroblastos entre os grupos ou entre as idades, mas chamamos a atenção que essas células tendem à diminuição em M30 e ao aumento em M60 em relação aos controles (Figura 6). A grande variação dos dados dessa análise talvez tenha sido responsável pela ausência de resultado estatístico significativo.

4.6 Quantificação das células musculares lisas

Em relação à quantidade de células musculares lisas, avaliada pela marcação de α -actina de músculo liso no estroma do lobo lateral prostático, foi notado que entre C30 e C60 houve uma redução de 30%, já na comparação entre M30 e M60 essa diminuição foi maior, sendo de 55%. Quando comparados os grupos controle e MIF^{-/-} de mesma idade, não há diferença significativa (Figura 7).

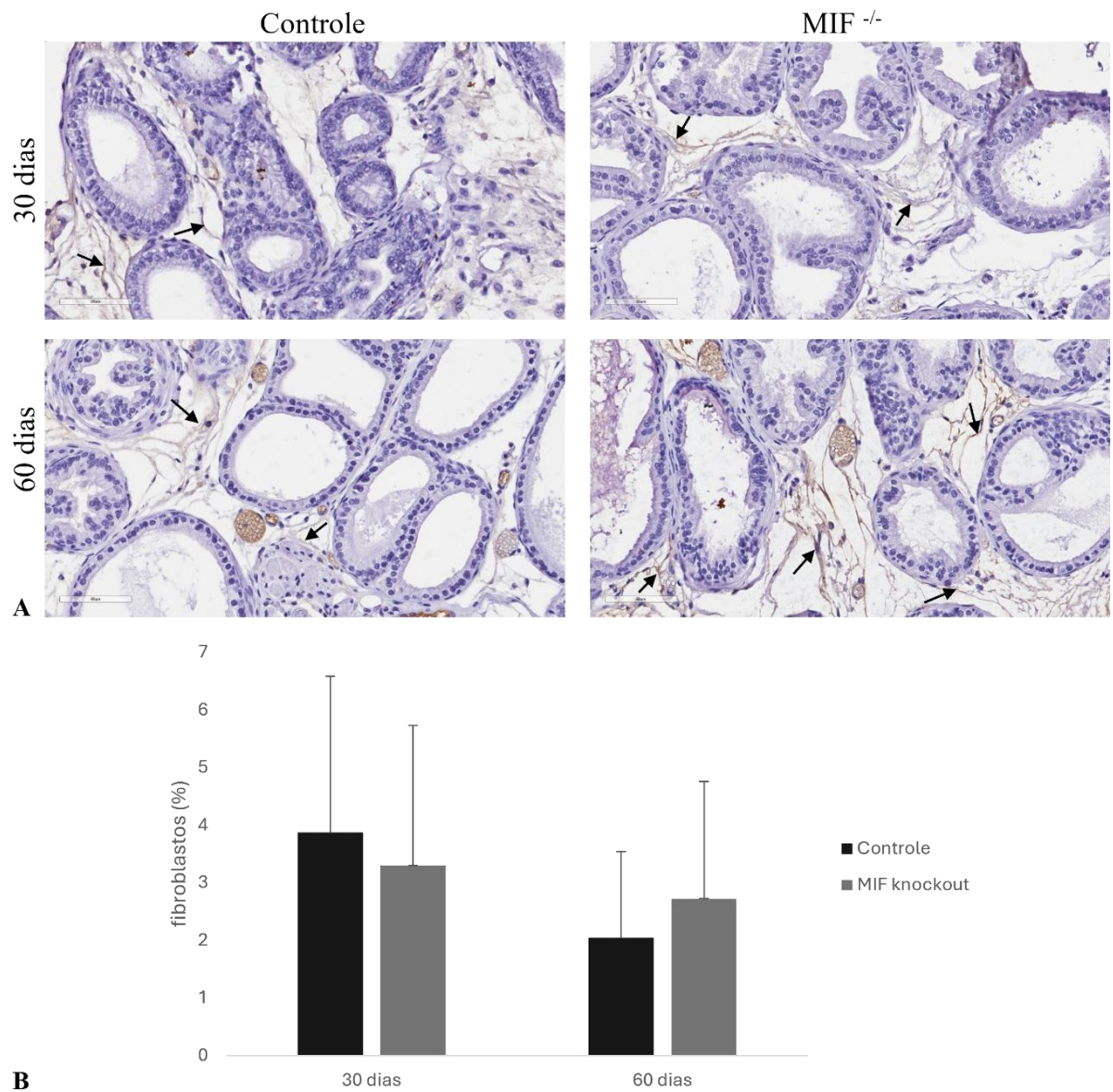


Figura 6 – Localização e quantificação de fibroblastos, através da marcação com vimentina, na próstata lateral de camundongos controle e MIF^{-/-} com 30 e 60 dias de vida. (A) Cortes histológicos da próstata lateral de camundongos de grupos controle e MIF *knockout* após imuno-histoquímica para vimentina. As setas apontam os fibroblastos. (B) Gráfico da frequência relativa de fibroblastos na próstata lateral de camundongos. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão ($p < 0.05$).

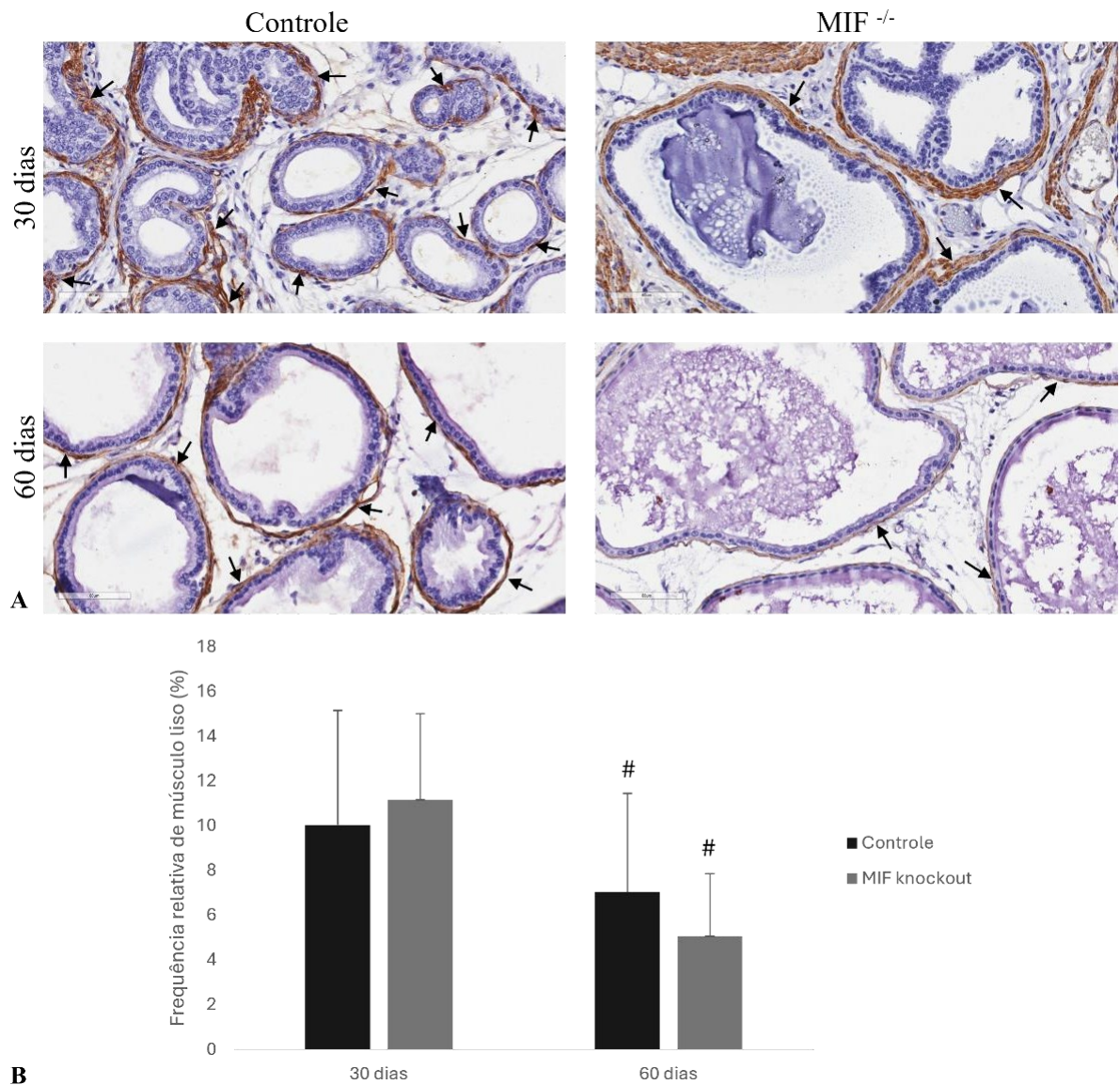


Figura 7 – Estudo das células musculares lisas na próstata lateral de camundongos controle e MIF^{-/-} com 30 e 60 dias de vida. (A) Cortes histológicos da próstata lateral após imuno-histoquímica para α -actina. As setas apontam as células musculares lisas que se localizam circundando os ácinos secretores. (B) Representação gráfica da frequência relativa de fibroblastos na próstata lateral de camundongos. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. #: diferença estatística entre idades do mesmo grupo ($p < 0.05$).

4.7 Avaliação de apoptose

Foi investigada ainda, uma possível interferência do MIF na morte celular por apoptose, tendo em vista o papel anti-apoptótico e pró- proliferativo geralmente atribuído a ele. Foi possível observar que a apoptose em animais MIF *knockout* foi mais acentuada do que nos animais controle, tanto ao longo do desenvolvimento, (52% de M30 para M60 em contraste com os 18% encontrados de C30 para C60), quanto na comparação entre os grupos na fase púbere, com um aumento de 19% na morte celular em M60 em relação a C60 (Figura 8).

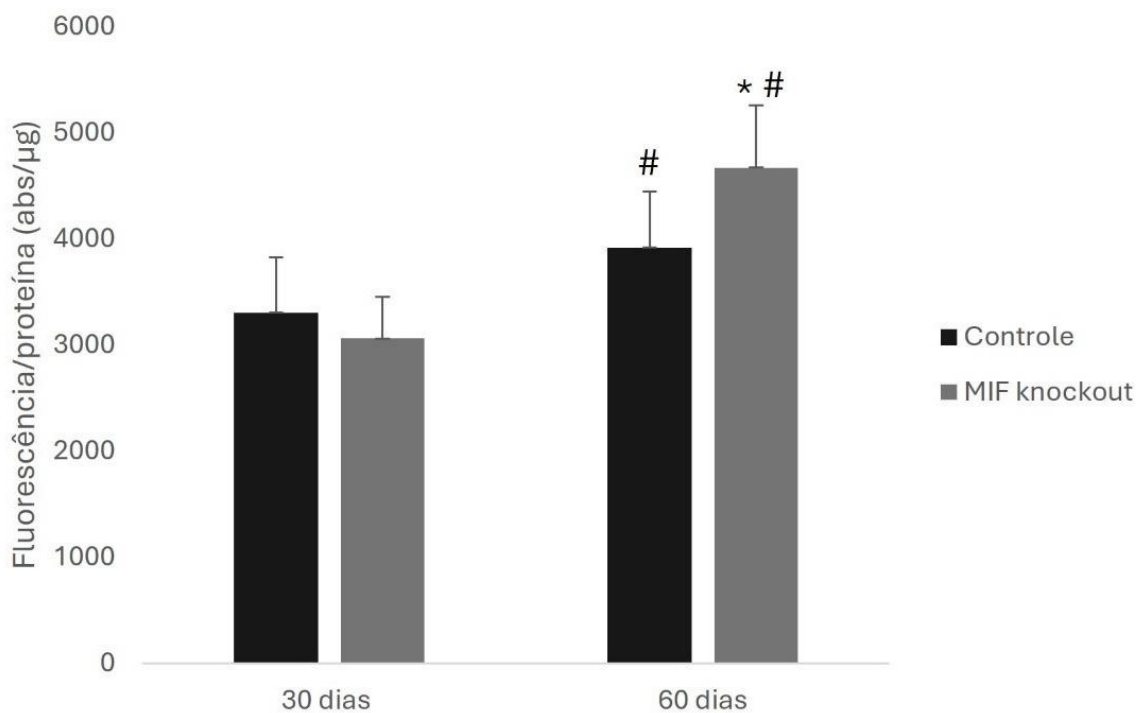


Figura 8 - Representação gráfica do conteúdo de caspase-3 ativa, dada por intensidade de fluorescência dividida pela concentração de proteína, na próstata de grupos de camundongos controle e MIF^{-/-} nas idades de 30 e 60 dias. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão. *: diferença estatística significativa entre grupos controle e *knockout*; #: diferença estatística significativa entre idades do mesmo grupo (p<0.05).

4.8 Quantificação da testosterona

Considerando que a testosterona é um andrógeno de grande importância no desenvolvimento prostático e na manutenção da função da glândula, analisamos os níveis plasmáticos desse hormônio. Os dados obtidos demonstraram que os camundongos MIF^{-/-} na fase pré-púbere apresentam os níveis de testosterona mais de 5 vezes maior do que o grupo controle na mesma idade (Figura 9). No entanto, quando analisamos a quantidade de testosterona ao longo do desenvolvimento, era esperado um aumento superior a 900% de 30

para 60 dias, algo que não foi visto nos indivíduos MIF *knockout* que, inclusive, apresentaram uma tendência de redução da concentração do hormônio na fase púbere (Figura 9).

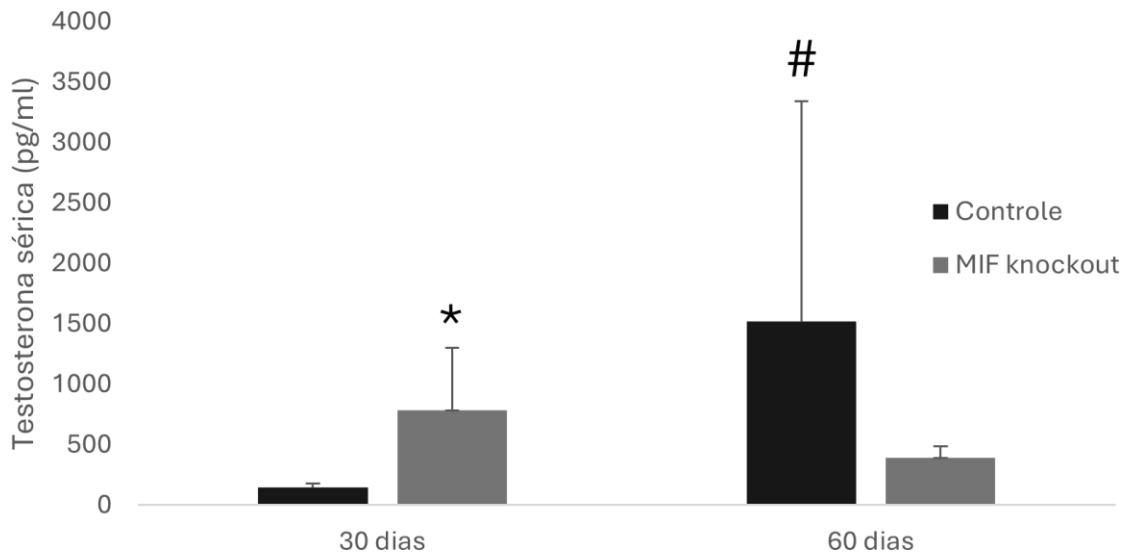


Figura 9 - Concentração de testosterona no plasma de camundongos controle e MIF^{-/-} nas idades de 30 e 60 dias. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão. *: diferença estatística significativa entre grupos controle e *knockout*; #: diferença estatística significativa entre idades do mesmo grupo (p<0.05).

5 DISCUSSÃO

O MIF é expresso constitutivamente na próstata e há fortes evidências de que ele se relaciona com distúrbios proliferativos da glândula (Arcuri *et al.*, 1999; Hussain *et al.*, 2013; Meyer-Siegler *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2020). A partir disso, vários estudos vêm sendo desenvolvidos visando a utilização do MIF como alvo terapêutico no tratamento dessas doenças, como o câncer de próstata (Al-Abed; Vanpatten, 2001; Kindt *et al.*, 2016; O'Reilly *et al.*, 2016). Embora a sua expressão já tenha sido encontrada na glândula e a sua relação com o câncer seja conhecida, a real importância dessa proteína para o desenvolvimento e funcionamento normal da próstata não foi completamente elucidada e nem os possíveis impactos de sua ausência. Logo, esse é o primeiro estudo sobre o desenvolvimento prostático em camundongos MIF *knockout*.

O MIF induz a proliferação celular por meio da ativação da via MAPK/ERK, além de promover a sobrevivência celular através da inibição da proteína supressora de tumor (p53) e da ativação da via de sinalização PI3K/AKT (Mitchell *et al.*, 1999; Hudson *et al.*, 1999; Lue *et al.*, 2007). Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram que a proliferação celular epitelial em animais MIF^{-/-} sofreu uma redução antecipada, ocorrida já na fase pré-púbere (30

dias), ao contrário do esperado, que seria uma diminuição ao longo do desenvolvimento púbere. Nesse contexto, Jin e colaboradores (2011) demonstraram que o MIF apresenta papel de destaque na proliferação das células epiteliais prostáticas, tanto em células epiteliais prostáticas normais (RWPE-1) e na linhagem celular de hiperplasia prostática benigna (BPH-1) quanto em modelo murino, e isso foi paralelo ao aumento da expressão de MIF-CD74. Além disso, um estudo da relação entre o MIF e a proliferação celular epitelial na hiperplasia prostática benigna (HPB) (Song *et al.*, 2020) mostrou que a citocina promove a proliferação tanto de células prostáticas normais quanto da linhagem de HPB. Logo, acreditamos que MIF exerce controle positivo e direto sobre a proliferação celular epitelial na próstata lateral. Por outro lado, no estroma a proliferação celular foi maior na fase púbere mesmo na ausência de MIF. Considerando que o MIF é expresso, majoritariamente, pelas células do epitélio glandular prostático (Arcuri *et al.*, 1999), nossa hipótese é que a proliferação celular estromal na ausência do MIF consiga ser compensada por outras vias proliferativas independentes dessa citocina na fase púbere.

A morte celular programada apresenta um papel importante no desenvolvimento pós-natal prostático, pois molda a arquitetura da glândula e garante sua organização correta ao eliminar as células em excesso. Os nossos dados mostraram que a apoptose é muito mais elevada no curso de desenvolvimento do grupo *knockout*. Ainda, quando comparado ao controle de mesma idade o grupo MIF^{-/-} 60 dias teve maior nível de morte celular programada. O trabalho de Lue e colaboradores (2007) buscou elucidar se a atividade anti-apoptótica do MIF estava relacionada a uma ativação da via de sinalização PI3K/AKT e os resultados mostraram que a citocina aumentou a atividade dessa via em diversas culturas celulares, indicando que a sobrevivência celular gerada por MIF estava pelo menos parcialmente relacionada a essa sinalização. Hussain e colaboradores (2013) avaliaram a utilização de anticorpos anti-MIF como proposta de tratamento para o câncer de próstata e observaram *in vitro* que esses anticorpos inibiram a ação do MIF na via AKT e promoveram a ativação das caspases 3 e 7, aumentando a apoptose. Os efeitos também puderam ser vistos em camundongos onde o tratamento atenuou o crescimento do tumor prostático xenográfico de maneira dose-dependente. Além disso, um estudo com células tumorais de próstata mostrou que células incubadas com MIF recombinante antes do tratamento com quimioterápico apresentaram apoptose significativamente reduzida (Tawandros *et al.*, 2013). Dessa forma, os dados que obtivemos estão de acordo com a literatura, indicando que MIF exerce um efeito anti-apoptótico na próstata e isso é importante para modular o desenvolvimento pós-natal da glândula; sua ausência pode impactar na correta formação dos ácinos.

O colágeno é produzido pelos fibroblastos e auxilia na manutenção da organização e função tecidual, além de atuar como uma espécie de “cola e estrutura” pericelular no reparo de tecidos (Karsdal *et al.*, 2017). Apesar de não apresentar diferenças significativas entre os grupos, notamos uma tendência de redução na quantidade de fibroblastos nos animais MIF *knockout* 30 dias e de aumento em 60 dias. Ao avaliar o conteúdo de colágeno, por outro lado, observamos que o grupo M30 apresenta diminuição significativa na frequência relativa de fibras colágenas associado à menor área de estroma. Apesar de não haver estudos sobre os efeitos de MIF nesses componentes na próstata, trabalhos envolvendo outros tecidos já foram descritos. Nesse sentido, foi demonstrado que a presença do MIF no meio de cultura aumenta a proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno, enquanto sua ausência não causa o mesmo efeito (Ningyan *et al.*, 2015). Xu e colaboradores (2016), estudando coração de camundongos MIF *knockout* jovens e velhos, mostraram que embora esperado um aumento significativo da fibrose intersticial entre as idades, os animais MIF^{-/-} velhos apresentaram fibrose muito superior, indicando que tanto o MIF quanto a idade são fatores a serem considerados e que a ação da citocina sobre esse componente é mais impactante no envelhecimento. Diante disso, acreditamos que a redução de colágeno no grupo M30 pode estar relacionada à inibição de MIF na proliferação de fibroblastos e estes por sua vez na síntese de colágeno. Ademais, a tendência de maior conteúdo de fibroblastos no grupo *knockout* 60 dias não se reflete no conteúdo de colágeno. Nossa hipótese é que, por algum motivo, os fibroblastos nessa fase não estão sendo estimulados na produção de colágeno de acordo com o esperado. Dessa forma, é necessário realizar testes complementares, tais como mensuração de TGF- β e MMP na próstata para uma avaliação mais completa.

As células musculares lisas possuem papel de destaque no desenvolvimento e função da próstata, devido a sua atuação na interação epitélio-estroma (Cunha *et al.*, 1996) de modo a estimular a formação do padrão acinar e garantir a contratilidade da glândula. Nossos resultados indicaram que a ausência de MIF pode estar relacionada com uma diminuição exacerbada da quantidade de músculo liso na passagem da fase pré-púbere para a púbere. Embora estudos sobre os efeitos do MIF no músculo liso da próstata em diferentes idades sejam inexistentes, pesquisas em outros tecidos podem ser usadas de modo comparativo. Nesse sentido, Taylor e colaboradores (2006) demonstraram que animais MIF *knockout* apresentam maior quantidade de músculo liso na bexiga e que o tratamento *in vitro* dessas células musculares lisas com MIF recombinante reduziu a viabilidade celular. Uma questão a ser considerada, no entanto, é que as células musculares lisas da próstata são altamente responsivas à presença de andrógenos, como a testosterona, de forma que esse hormônio é capaz de preservar o fenótipo dessas células

(Leimgruber *et al.*, 2016) bem como apresenta um papel pró-homeostático, modulando a proliferação, e a diferenciação epitelial através da interação epitélio-estroma (Peinetti *et al.*, 2018). Diante disso, acreditamos que a quantidade reduzida de testosterona observada nos animais MIF *knockout*, que será tratada a seguir, pode estar relacionada com essa tendência de diminuição de músculo liso mais pronunciada nesses indivíduos.

A testosterona, como citado anteriormente, é um andrógeno de grande importância na regulação funcional e de crescimento da próstata. Os dados obtidos mostraram que animais MIF^{-/-} apresentam uma concentração de testosterona 5 vezes superior à do grupo controle na fase pré-púbere. Entretanto, ao longo do desenvolvimento, é esperado um aumento de mais de 900% na quantidade desse andrógeno e, o que encontramos foi uma redução de testosterona entre a fase pré-púbere e púbere de MIF^{-/-}, embora os dados não tenham atingido significância estatística, muito provavelmente pela alta variação dos dados. Uma pesquisa demonstrou que os níveis de plasmáticos de MIF são correlacionados positivamente com os de testosterona em humanos (Aloisi *et al.*, 2005). De modo semelhante, essa correlação também foi observada em uma avaliação da quantidade de MIF circulante na síndrome do ovário policístico, onde os níveis de testosterona também são elevados (González *et al.*, 2010). As células de Leydig testiculares apresentam alta expressão de MIF e essa citocina tem influência na esteroidogênese. Anahara *et al.* (2006) demonstraram que camundongos MIF^{-/-} de 80 dias de idade apresentam reduzidos níveis de testosterona e estradiol intratesticulares, mostrando que essa citocina tem relevância na produção dos hormônios sexuais. Comparando nossos dados com esse estudo, é possível que os efeitos da inexpressão de MIF na redução da esteroidogênese seja um processo estabelecido entre as idades púbere e adulta. Nossa hipótese é que, na fase pré-púbere, algum mecanismo alternativo compensa a ausência do MIF e faz com que os níveis de testosterona sejam superiores, como por exemplo a D – Dopacroma Tautomerase (D-DT), homólogo estrutural do MIF, que compartilha diversas atividades com ele, inclusive o receptor (Merk *et al.*, 2012). No entanto, o organismo tenta reestabelecer a homeostase após esse aumento inesperado, tendendo à redução observada em 60 dias. Assim, podemos sugerir que a ausência de MIF tem papel relevante nos níveis androgênicos e através desse estímulo isso influencia os tecidos andrógeno-dependentes, como a próstata. Essa hipótese se corrobora quando observamos o maior peso da próstata no grupo M30, fase em que a testosterona está elevada. O mesmo não é encontrado no grupo M60, onde os níveis de testosterona não estão mais elevados.

Finalmente, a análise da frequência relativa de epitélio, lúmen e estroma é o reflexo morfológico de todos os resultados tratados acima. No epitélio, camundongos MIF^{-/-}

apresentaram redução maior que a esperada ao longo do desenvolvimento, bem como aumento inferior no lúmen. Tais observações podem ser relacionadas com a proliferação celular epitelial antecipadamente reduzida nesse grupo, bem como o aumento significativo da apoptose na passagem da pré-puberdade para a puberdade. A menor proliferação em conjunto com a morte celular maior levou a uma diminuição mais acentuada no epitélio prostático no curso do desenvolvimento.

6 CONCLUSÃO

A presente investigação mostrou que a ausência de MIF trouxe alterações significativas na próstata lateral de camundongos nas fases pré-púbere e púbere. MIF regula positivamente a proliferação celular na glândula e inibe a apoptose, além de ter influência nos níveis de testosterona, o que impacta no peso da próstata. Desse modo, pudemos concluir que a sinalização MIF apresenta relevância para o correto desenvolvimento da próstata e que sua ausência apresenta impacto no lobo lateral prostático, principalmente por meio da redução de componentes importantes de estrutura e contratilidade.

7 REFERÊNCIAS

- AL-ABED, Y.; VANPATTEN, S. **MIF as a disease target: ISO-1 as a proof-of-concept therapeutic. Future Medicinal Chemistry**, 2011. Doi: 10.4155/fmc.10.281
- ALOISI, A. M. et al. Gender-related effects of chronic non-malignant pain and opioid therapy on plasma levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF). **Pain**, v. 115, n. 1–2, p. 142–151, 2005. Doi: 10.1016/j.pain.2005.02.019
- ANAHARA, R. et al. Deletion of macrophage migration inhibitory factor gene induces down regulation of sex hormones and ultrastructural abnormalities in mouse testes. **Reproductive Toxicology**, 21(2), 167–170, 2006. doi:10.1016/j.reprotox.2005.08.00
- ARCOLINO, F. O. et al. Proliferation and apoptotic rates and increased frequency of p63-positive cells in the prostate acinar epithelium of alloxan-induced diabetic rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 91, n. 2, p. 144-154, abr. 2010.
- ARCURI, F. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Human Prostate: Identification and Immunocytochemical Localization. **The Prostate**, v. 39, p. 159–165, 1999. Doi: 10.1002/(sici)1097-0045(19990515)39:3<159::aid-pros3>3.0.co;2-m
- BERQUIN, I. M. et al. Expression signature of the mouse prostate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 43, p. 36442–36451, 2005. Doi: 10.1074/jbc.M504945200
- BHAVSAR, A.; VERMA, S. Anatomic Imaging of the Prostate. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014. Doi: 10.1155/2014/728539
- BLOOM, B. R.; BENNETT, B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. **Science**. v. 153, n. 3731, p. 80-2, 1966.
- BUSKIN, A.; SINGH, P.; LORENZ, O.; ROBSON, C.; STRAND, D. W.; HEER, R. A Review of Prostate Organogenesis and a Role for iPSC-Derived Prostate Organoids to Study Prostate Development and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, n. 23, p. 13097, 2021.
- CROWLEY, L. et al. A single-cell atlas of the mouse and human prostate reveals heterogeneity and conservation of epithelial progenitors. **eLife**, v. 9, p. 1–24, 2020. Doi: 10.7554/ELIFE.59465
- CUNHA, G. R. et al. Smooth Muscle-Epithelial Interactions in Normal and Neoplastic Prostatic Development. **Acta Anatomica**, v. 155, p. 63–72, 1996. Doi: 10.1159/000147791
- CUNHA, G. R. Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future. **Differentiation**. v. 76, n. 6, p. 578-586, 2008.
- 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. 417-434, dez. 2004a.

CUNHA, G. R.; DONJACOUR, A. A.; COOKE, P. S.; MEE, S.; BIGSBY, R. M.; HIGGINS, S. J.; SUGIMURA, Y. The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocrine Reviews**. v. 8, n. 3, p. 338-362, 1987.

CUNHA, G. R.; RICKE, W.; THOMSON, A.; MARKER, P. C.; RISBRIDGER, G.; HAYWARD, S. W.; WANG, Y. Z.; DONJACOUR, A. A.; KURITA, T. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 92, n. 4, p. 221–236, 2004b. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.10.017>

CUNHA, G. R.; VEZINA, C. M.; ISAACSON, D.; RICKE, W. A.; TIMMS, B. G.; CAO, M.; FRANCO, O.; BASKIN, L. S. Development of the human prostate. **Differentiation**. v. 103, n.1, p. 24-45, 2018.

DAVEY, R. A.; GROSSMANN, M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. **Clin Biochem Rev**. v. 37, n. 1, p. 3-15, 2016.

DAVID, J. R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 56, n. 1, p. 72-77, 1966.

DE MARZO, A. M. et al. Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. **The Journal of Urology**, v. 160, n. 6 (pt 2), p. 2381-2392, 1998.

FARNSWORTH, W. E. Prostate Stroma: Physiology. **The Prostate**. v. 38, n.1, p. 60–72, 1999. doi:10.1002/(sici)1097-0045(19990101)38:1<60::aid-pros8>3.0.co;2-3

FRANCIS, J. C.; SWAIN, A. Prostate Organogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v. 8, n. 7, p. a030353, 2018.

GINJA, M.; PIRES, M. J.; GONZALO-ORDEN, J. M.; SEIXAS, F.; CORREIA-CARDOSO, M.; FERREIRA, R.; FARDILHA, M.; OLIVEIRA, P. A.; FAUSTINO-ROCHA, A. I. Anatomy and Imaging of Rat Prostate: Practical Monitoring in Experimental Cancer-Induced Protocols. **Diagnostics (Basel)**. v. 9, n. 3, p. 68, 2019.

GONZÁLEZ, F. et al. Elevated circulating levels of macrophage migration inhibitory factor in polycystic ovary syndrome. **Cytokine**, v. 51, n. 3, p. 240–244, 2010. Doi: 10.1016/j.cyto.2010.06.008

HAYWARD, S. W.; CUNHA, G. R. THE PROSTATE: DEVELOPMENT AND PHYSIOLOGY. **Radiologic Clinics of North America**. v. 38, n. 1, p. 1-14, 2000.

hormonal responses. **Archives of Histology and Cytology**, v. 67, n. 5, p. 417-434, dez.

HULEIHEL, M.; ABOFOUL-AZAB, M.; ABARBANEL, Y.; EINAV, I.; LEVITAS, E.; LUNENFELD, E. Production of Macrophage Inhibitory Factor (MIF) by Primary Sertoli Cells; Its Possible Involvement in Migration of Spermatogonial Cells. **Journal of cellular physiology**, v. 232, n. 10, p. 2869–2877, 2017. <https://doi.org/10.1002/jcp.25718>

HUSSAIN, F. et al. Human anti-macrophage migration inhibitory factor antibodies inhibit growth of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 12, n. 7, p. 1223–1234, 2013. Doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0988

ITTMANN, M. Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. **Cold Spring Harb Perspect Med.** v. 8, n. 5, p. a030346, 2018.

ITTMANN, M. et al. Animal models of human prostate cancer: The consensus report of the new york meeting of the mouse models of human cancers consortium prostate pathology committee. **Cancer Research**, v. 73, n. 9, p. 2718–2736, 2013. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4213

JANKAUSKAS, S. S.; WONG, D. W. L.; BUCALA, R.; DJUDJAJ, S.; BOOR, P. Evolving complexity of MIF signaling. **Cellular signalling**, v. 57, p. 76–88. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.01.006>

JESIK, C. J.; HOLLAND, J. M.; LEE, C. An Anatomic and Histologic Study of the Rat Prostate. **The Prostate**, v. 3, n. 1, p. 81-97, 1982.

JIN, J. et al. 1581 MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR: A CENTRAL REGULATOR OF PROSTATIC EPITHELIAL CELL PROLIFERATION. **Journal of Urology**, v. 185, n. 4S, 2011. Doi: 10.1016/j.juro.2011.02.1617

KARSDAL, M. A. et al. The good and the bad collagens of fibrosis – Their role in signaling and organ function. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 121, p. 43–56, 2017. Doi: 10.1016/j.addr.2017.07.014

KINDT, N. et al. Involvement of macrophage migration inhibitory factor in cancer and novel therapeutic targets (Review). **Oncology Letters**, v. 12, n. 4, p. 2247–2253, 2016. Doi: 10.3892/ol.2016.4929

LEIMGRUBER, C. et al. Testosterone Rescues the De-Differentiation of Smooth Muscle Cells Through Serum Response Factor/Myocardin. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 10, p. 2806–2817, 2017. Doi: 10.1002/jcp.25679

LEVESQUE, C.; NELSON, P. S. Cellular Constituents of the Prostate Stroma: Key Contributors to Prostate Cancer Progression and Therapy Resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v.8, n.8 a030510. 2018 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030510>

LUE, H. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. **Oncogene**, v. 26, n. 35, p. 5046–5059, 2007. Doi: 10.1038/sj.onc.1210318

MCNEAL, J. E. Normal histology of the prostate. **The American Journal of surgical Pathology**, v. 12, n. 8, p. 619-633, ago. 1988.

MERK, M.; MITCHELL, R. A.; ENDRES, S.; BUCALA, R. D-dopachrome tautomerase (DDT or MIF2): doubling the MIF cytokine Family. **Cytokine**. v. 59, n. 1, p. 10-17, 2012. Doi: 10.1016/j.cyto.2012.03.014.

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.; ICZKOWSKI, K. A.; VERA, P. L. Further evidence for increased macrophage migration inhibitory factor expression in prostate cancer. **BMC Cancer**, v. 5, 2005. Doi: 10.1186/1471-2407-5-73

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.

MITCHELL, R. A. et al. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF): Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 25, p. 18100–18106, 1999. Doi: 10.1074/jbc.274.25.18100

NINGYAN, G. et al. The role of macrophage migration inhibitory factor in mast cell-stimulated fibroblast proliferation and collagen production. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 2015. Doi: 10.1371/journal.pone.0122482

O'REILLY, C. et al. Targeting MIF in Cancer: Therapeutic Strategies, Current Developments, and Future Opportunities. **Medicinal Research Reviews**, v. 36, n. 3, p. 440–460, 2016. Doi: 10.1002/med.21385

OLIVEIRA, D. S. M. et al. The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**. v. 16, n. 1, p. 8-13, 2016.

PEINETTI, N. et al. The response of prostate smooth muscle cells to testosterone is determined by the subcellular distribution of the androgen receptor. **Endocrinology**, v. 159, n. 2, p. 945–956, 2018. Doi: 10.1210/en.2017-00718

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.

PRICE D. 1963. Comparative aspects of development and structure in the prostate. **Nat Can Inst Monogr** 12: p. 1-27.

SHAPPELL, S. B. et al. Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. **CANCER RESEARCH**, v. 64, p. 2270–2305, 2004. Doi: 10.1158/0008-5472.can-03-0946

SHARMA, M. et al. The Prostate Gland. Em: **Basics of Human Andrology**. Singapore: Springer Singapore, p. 17–35, 2017. Doi: 10.1007/978-981-10-3695-8_2

SONG, H. et al. The role of macrophage migration inhibitory factor in promoting benign prostatic hyperplasia epithelial cell growth by modulating COX-2 and P53 signaling. **Biology Open**, v. 9, n. 11, 2020. Doi: 10.1242/BIO.053447

SUMAIYA, K.; LANGFORD, D.; NATARAJASEENIVASAN, K.; SHANMUGHAPRIYA, S. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): A multifaceted cytokine regulated by genetic and physiological strategies. **Pharmacol Ther.** v. 233. n. 108024, 2022.

TABOGA, S. R.; VILAMAIOR, P. S. L; GÓES, R. M. Modulação androgênica e estrogênica na próstata: uma abordagem em modelos experimentais de roedores com enfoque na biologia estrutural. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 8, p. 946–955, 2009. Doi: 10.1590/S0004-27302009000800007

TAWADROS, T. et al. Release of macrophage migration inhibitory factor by neuroendocrine differentiated LNCaP cells sustains the proliferation and survival of prostate cancer cells. **Endocrine-Related Cancer**, v. 20, n. 1, p. 137–149, 2013. Doi: 10.1530/ERC-12-0286

TAYLOR, J. A. et al. Null mutation in macrophage migration inhibitory factor prevents muscle cell loss and fibrosis in partial bladder outlet obstruction. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 291, n. 6, 2006. Doi: 10.1152/ajprenal.00144.2006

VALKENBURG, K. C.; WILLIAMS, B. O. Mouse Models of Prostate Cancer. **Prostate Cancer**, v. 2011, p. 1–22, 2011. Doi: 10.1155/2011/895238

VICKMAN, R. E. et al. The role of the androgen receptor in prostate development and benign prostatic hyperplasia: A review. **Asian Journal of Urology**, v. 7, n. 3, p. 191–202, 2020. Doi: 10.1016/j.ajur.2019.10.003

WEGNER, K. A. et al. Prostate epithelial-specific expression of activated PI3K drives stromal collagen production and accumulation. **Journal of Pathology**, v. 250, n. 2, p. 231–242, 2020. Doi: 10.1002/path.5363

XU, X. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Deficiency Exacerbates Aging-Induced Cardiac Remodeling and Dysfunction Despite Improved Inflammation: Role of Autophagy Regulation. **Scientific Reports**, v. 6, 2016. Doi: 10.1038/srep22488

YUAN, X.; BALK, S. P. Mechanisms mediating androgen receptor reactivation after castration. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 27, n. 1, p. 36–41, 2009. Doi: 10.1016/j.urolonc.2008.03.021

ZHANG, Y.; NOJIMA, S.; NAKAYAMA, H.; JIN, Y.; ENZA, H. Characteristics of normal stromal components and their correlation with cancer occurrence in human prostate. **Oncology Reports**. v.10, p. 207-211, 2003 doi:10.3892/or.10.1.207