

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

JÚLIA EDUARDA MESQUITA MATOS

PAPEL DO FATOR DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS
(MIF) NO DESENVOLVIMENTO PÚBERE DA PRÓSTATA VENTRAL DE
CAMUNDONGOS

UBERLÂNDIA-MG

2025

JÚLIA EDUARDA MESQUITA MATOS

PAPEL DO FATOR DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS
(MIF) NO DESENVOLVIMENTO PÚBERE DA PRÓSTATA VENTRAL DE
CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas (PPGBC),
vinculado ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da
Universidade Federal de Uberlândia (UFU) como
requisito parcial à obtenção do título de mestre em
Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Lisboa Ribeiro

Linha de Pesquisa: Biologia da Reprodução.

UBERLÂNDIA-MG

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M425p Matos, Júlia Eduarda Mesquita, 2000-
2025 Papel do fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) no
desenvolvimento púbere da próstata ventral de camundongos [recurso
eletrônico] / Júlia Eduarda Mesquita Matos. - 2025.

Orientadora: Daniele Lisboa Ribeiro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas .
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2025.5073>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Biologia. I. Ribeiro, Daniele Lisboa, 1981-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-graduação em
Biologia Celular e Estrutural Aplicadas . III. Título.

CDU: 573

André Carlos Francisco
Bibliotecário-Documentalista - CRB-6/3408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
 Aplicadas
 Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico , número 02/2025, do PPGBC				
Data:	18 de Março de 2025	Hora de início:	14:03	Hora de encerramento:	17:04
Matrícula do Discente:	12312BCE002				
Nome do Discente:	Júlia Eduarda Mesquita Matos				
Título do Trabalho:	Papel do Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF) no desenvolvimento púbere da próstata ventral de camundongos				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Biologia da Reprodução				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Papel do Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF) no desenvolvimento púbere da próstata ventral de camundongos				

Reuniu-se, por Videoconferência, a **Banca Examinadora** designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas/PPGBC, assim composta: Professores Doutores: **Patricia Simone Leite Vilamaior** - UNESP; **Manoel Francisco Biancardi** – UFG; e **Daniele Lisboa Ribeiro** orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Daniele Lisboa Ribeiro, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à **Discente** Júlia Eduarda Mesquita Matos a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando a candidata:

Aprovada

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Daniele Lisboa Ribeiro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/03/2025, às 17:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Simone Leite Vilamaior, Usuário Externo**, em 18/03/2025, às 17:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Manoel Francisco Biancardi, Usuário Externo**, em 18/03/2025, às 17:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6162552** e o código CRC **0D7ACBB2**.

Dedico este trabalho aos meus pais, por me permitirem realizar os meus sonhos, por renunciarem a tantas coisas para que eu pudesse chegar até aqui. Cheguei! E continuarei dando orgulho a vocês...

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me guiado nesse caminho e me dado forças para ir até o fim e à Nossa Senhora, por sempre estar comigo e me proteger.

Aos meus pais, Márcia e Eduardo, por nunca medirem esforços para me ver conquistando meus sonhos, por me apoiarem incansavelmente e por serem a base de tudo. À minha irmã, Gabriella, por vibrar com as minhas conquistas. Ao meu noivo, Yuri, por sempre me apoiar nos meus sonhos e estar comigo (mesmo distante) em todas as situações, desde o início do mestrado.

À minha orientadora, Prof. Dra. Daniele, por me aceitar em seu laboratório, por todos os direcionamentos e ensinamentos, principalmente em morfologia, pela dedicação, paciência e todas as correções ao longo do trabalho, o que foi essencial para concluí-lo e para meu aprendizado.

À FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pela concessão da bolsa de estudos, que foi uma grande ajuda financeira e incentivo para prosseguir nessa jornada.

Aos meus colegas de laboratório, Luiz Felipe, Marina e Laura, que tanto me ajudaram e contribuíram nos experimentos e foram essenciais para a conclusão deste trabalho, além das boas conversas e companhias no dia a dia.

À Francielly, amizade especial que conquistei já no início do mestrado, obrigada por todo o apoio, por acreditar no meu potencial, por ser minha companheira e uma grande amiga.

Aos meus demais familiares, em especial, meus avós Vani e Zico e meus padrinhos Marlene e Antônio, os quais sempre estiveram presentes, me apoiando de todas as formas.

À secretária do departamento, Fabiana, pelo seu jeito doce e seu bom dia dado com sorriso no rosto, por sempre me acolher e me escutar. Aos técnicos do laboratório de histologia, William e Fabrício, por ajudarem no que eu precisava e pela companhia.

A todos os demais profissionais, técnicos e professores, os quais foram essenciais na minha jornada como mestranda e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. Em especial, às professoras Dra. Bellisa de Freitas Barbosa e Dra. Tatiana Carla Tomiosso e à pós-doutoranda Fernanda Carolina Ribeiro Dias, pelas contribuições na banca de qualificação. Aos professores Dr. Manoel Francisco Biancardi e Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior por aceitarem compor a banca de defesa da dissertação.

Aos colegas de laboratório, Anna Laura, Maria Eduarda e Phelipe, por cada palavra trocada, cada conversa, cada risada, cada almoço no RU... por simplesmente serem minha companhia muitas das vezes.

Às minhas amigas, Carol, Helena e Geovanna, que sempre participaram (mesmo distantes) desse percurso.

“São as perguntas que não sabemos responder que
mais nos ensinam. Elas nos ensinam a pensar.”

(Patrick Rothfuss)

RESUMO

O fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) é uma proteína multifuncional e pleiotrópica que pode ativar mecanismos antiapoptóticos, pró-proliferativos e pró-inflamatórios. Embora seja expresso na próstata, sua importância nesta glândula não é totalmente compreendida. Assim, foi avaliada a contribuição de MIF para o desenvolvimento da próstata ventral em camundongos púberes e adultos. Camundongos de 30 ou 60 dias das linhagens C57BL/6 WT (tipo selvagem) e MIF^{-/-} (knockout) foram usados neste estudo. Foram realizadas quantificação sérica de testosterona, análises histológicas, imuno-histoquímica (alfa-actina, vimentina, PCNA, AR, WNT5a) e western blotting para ERK1/2. Os níveis séricos de testosterona foram muito mais altos nos camundongos MIF^{-/-}30, o que demonstra uma sinalização androgênica maior nesse grupo. Embora o peso corporal em MIF^{-/-}60 e o peso prostático em MIF^{-/-}30 tenham sido maiores do que seus pares do tipo selvagem, o aumento de peso corporal e prostático ao longo da puberdade foi muito menor nos animais MIF^{-/-}. Os camundongos MIF^{-/-}30 apresentaram redução no epitélio, aumento no lúmen e diminuição no conteúdo de colágeno e células musculares lisas na próstata. Quanto à proliferação celular, houve uma redução significativa nos camundongos MIF^{-/-} de ambas as idades. Além disso, os camundongos púberes MIF^{-/-} apresentaram ativação elevada da ERK e aumento no conteúdo de AR e WNT5a na próstata. Durante o desenvolvimento prostático, as mudanças encontradas nos camundongos do tipo selvagem são esperadas, mas no grupo MIF^{-/-} isso já é muito evidente aos 30 dias, demonstrando que a ausência de MIF antecipa o desenvolvimento puberal. Portanto, MIF tem um papel importante na estimulação da proliferação e no controle dos estímulos androgênicos, o que contribui para a coordenação temporal do curso do desenvolvimento da próstata da puberdade à fase adulta.

Palavras-chave: próstata; MIF; knockout; desenvolvimento; morfologia.

ABSTRACT

The macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a multifunctional pleiotropic protein that can activate anti-apoptotic, pro-proliferative and pro-inflammatory mechanisms. Although it is expressed in the prostate, its importance in this gland is not fully understood. So, the contribution of MIF for the development of ventral prostate was evaluated in pubertal and adult mice. Mice aged 30 or 60 days from C57BL/6 WT (wild type) and MIF^{-/-} (knockout) lineages were used for this study. Serum testosterone quantification, histological analyses, immunohistochemistry (alpha-actin, vimentin, PCNA, AR, WNT5a) and western blotting for ERK1/2 were performed. Testosterone serum levels were much higher in MIF^{-/-}30 mice, which shows a greater androgenic signaling in this group. Although body weight in MIF^{-/-}60 and prostate weight in MIF^{-/-}30 were greater than their wild-type pairs, body and prostate weight gain throughout pubertal stage was much lower in MIF^{-/-} animals. MIF^{-/-}30 showed a reduction in epithelium, an increase in lumen and decreased collagen and smooth muscle cells content in the prostate. As regards cell proliferation, there was an important reduction in MIF^{-/-} mice of both ages. Additionally, pubertal MIF^{-/-} mice presented elevated ERK activation and also increased score of AR and WNT5a in prostate. During the course of prostate development, the changes found in wild-type mice are expected but in MIF^{-/-} group it is already very evident at 30 days, demonstrating that the absence of MIF anticipates the pubertal development. Therefore, MIF has an important role in stimulating proliferation and controlling androgenic stimuli, which contributes to the temporal coordination of the course of prostate development from puberty to adulthood.

Keywords: prostate; MIF; knockout; development; morphology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ilustração esquemática da próstata de humanos e camundongos e estruturas adjacentes.....	18
Figura 2: Corte histológico transversal da próstata de camundongos: lobos prostáticos	19
Figura 3: Células que compõem o epitélio prostático glandular	20
Figura 4: Desenvolvimento da próstata.....	22
Figura 5: Sinalização de andrógenos e AR nas células prostáticas	24
Figura 6: A expressão do AR nos tipos celulares prostáticos durante o desenvolvimento.....	25
Figura 7: Vias da regulação da morfogênese de ramificação da próstata.....	27
Figura 8: Mecanismos da sinalização de MIF	30
Figura 9: Análise estereológica de epitélio, lúmen, estroma e colágeno.....	38
Figura 10: Avaliação dos fibroblastos e células musculares lisas	39
Figura 11: Análise das células em proliferação e da expressão de ERK.....	40
Figura 12: Análise do conteúdo de AR e WNT5a.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados nos ensaios de imunohistoquímica e <i>western blotting</i>	35
Tabela 2: Dados biométricos de peso corporal, peso da próstata e dosagem sérica de testosterona	36

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK Quinase ativada por AMP

APCs Células apresentadoras de antígenos

AR Receptor de andrógenos

BSA Albumina de soro bovino

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DAB Antígeno de adesão derivado de células

DHT Dihidrotestosterona

ELISA Ensaio de imunoabsorção enzimática

ERK1/2 Quinase regulada por sinal extracelular

FGF10 Fator de crescimento de fibroblastos 10

Fzd Frizzled

H&E Hematoxilina e eosina

HPB Hiperplasia prostática benigna

HRP Peroxidase endógena

JAB1 Proteína 1 de ligação ao domínio de ativação JUN

LH Hormônio luteinizante

MAPK Quinases ativadas por mitógenos

MHCII Complexo principal de histocompatibilidade classe II

MIF Fator de inibição da migração de macrófagos

MIF^{-/-} Camundongo MIF knockout

MIF^{-/-}30 Camundongo MIF knockout de 30 dias

MIF^{-/-}60 Camundongo MIF knockout de 60 dias

MLC Cadeia leve da miosina

MLCK Quinase de cadeia leve da miosina

Na₃VO₄ Ortavanadato de sódio

p53 Supressor de tumor

PAcP Fosfatase ácida prostática

PCNA Antígeno nuclear de proliferação celular

PI3K Quinase fosfatidilinositol 3

PMSF Fenilmetilsulfonilfluoreto

PSA Antígeno prostático específico

REBIR Rede de biotérios de roedores

SHBG Globulina de ligação a hormônios sexuais

SRC Tirosina-quinase proto-oncogênica

T Testosterona

TBST Tampão tris salino com tween 20

UFU Universidade Federal de Uberlândia

UGE Epitélio do seio urogenital

UGM Mensênquima do seio urogenital

UGS Seio urogenital

Wnt *Wingless-Int-1*

WT Camundongo Selvagem

WT30 Camundongo selvagem de 30 dias

WT60 Camundongo selvagem de 60 dias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Estrutura, função e morfologia da próstata	16
2.2 Desenvolvimento da próstata	21
2.3 Sinalização androgênica e interação epitélio-estroma na próstata	23
2.4 Vias de sinalização proliferativas e o desenvolvimento da próstata	26
2.5 MIF: função, mecanismo de ação e associação a vias proliferativas	27
2.6 MIF e sua expressão na próstata.....	31
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Animais	32
4.2 Análise histológica e estereológica	33
4.3 Imunohistoquímica	33
4.4 <i>Western blotting</i>	34
4.5 Quantificação de testosterona.....	35
4.6 Análise estatística	35
5 RESULTADOS	36
5.1 A ausência de MIF provoca menor peso corporal e maior peso da próstata associado a maiores níveis de testosterona	36
5.2 A histoarquitetura da próstata é influenciada por MIF.....	36
5.3 MIF tem papel no desenvolvimento estromal, modulando a organização de células musculares lisas e deposição de colágeno.....	36
5.4 A proliferação celular na próstata é reduzida com o knockout de MIF	37
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

A próstata, uma glândula exócrina acessória do sistema reprodutor masculino, extremamente importante na manutenção funcional desse sistema e, consequentemente, na reprodução, secreta um componente fluido e alcalino, que junto aos espermatozoides e secreção de outras glândulas, compõem o sêmen (ITTMANN, 2018; FRANCIS e SWAIN, 2018). O seu desenvolvimento se inicia durante a embriogênese, a partir do seio urogenital (UGS), mas tem uma importante fase pós-natal, além da maturação ser finalizada durante a puberdade (SUGIMURA *et al.*, 1986; VILAMAIOR *et al.*, 2006; FRANCIS e SWAIN, 2018; BUSKIN *et al.*, 2021). Em camundongos, ainda na fase gestacional, ocorre o pré-brotamento aos dias 13 a 15, e o brotamento inicial entre os dias 16 a 18. Já na fase pós-natal, do nascimento a puberdade, nos primeiros dois meses de vida ocorrem o alongamento e a ramificação dos brotos, a canalização ductal e a citodiferenciação (CUNHA *et al.*, 2018). Tais eventos são marcados por uma abundante atividade proliferativa no epitélio prostático (VILAMAIOR *et al.*, 2006).

Sabe-se que a próstata se desenvolve e se mantém funcional a partir do estímulo de andrógenos, como a testosterona, secretados pelas células de Leydig nos testículos (HAYWARD e CUNHA, 2000; BUSKIN *et al.*, 2021). Os receptores de andrógenos (AR) são expressos nas células do seio urogenital, nas células epiteliais e estromais (CUNHA *et al.*, 2018). Nas células musculares lisas, sua ativação é responsável por mediar a produção de fatores de crescimento de atuação parácrina nas células epiteliais (CUNHA, 1972 e 2008), resultando em um processo chamado interação epitélio-estroma. Esse processo é essencial para o desenvolvimento intrauterino e pós-natal e para a manutenção ativa da próstata. Além do estímulo androgênico, outras vias de sinalização são importantes, como a das MAPK (quinases ativadas por mitógenos), que pode ativar ERK1/2 (quinase regulada por sinal extracelular), regulando a proliferação, diferenciação, dentre outras atividades (RUBINFELD e SEGER, 2005; ROSKOSKI, 2012), sendo uma sinalização importante para a ramificação dos ductos prostáticos (ZHANG *et al.*, 2008). Também se destaca, o WNT5a, que por ter um papel no desenvolvimento embrionário, na diferenciação celular e na proliferação (PENG *et al.*, 2009; CHENG *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2015), pode modular o brotamento, a ramificação e a formação de lúmen na próstata (ALLGEIER *et al.* 2008; HUANG *et al.* 2009). Ademais, vias envolvidas em morte celular também são importantes para a canalização dos ductos e a formação luminal (BRUNI-CARDOSO e CARVALHO, 2007).

O fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) é uma proteína multifuncional pleiotrópica com um papel fundamental na imunidade inata e adaptativa (CALTABIANO *et*

al., 2021; ANAHARA *et al.*, 2006), além de atuar como uma citocina pró-inflamatória, antiapoptótica e pró-proliferativa (PENTICUFF *et al.*, 2019). Ele pode se ligar ao receptor CD74 ou, ainda, a complexos de receptores, incluindo o CD74 ligado aos correceptores CXCR2, CXCR4 ou CD44, ativando diversas vias de sinalização, como a MAPK. Também pode atuar por vias independentes de receptor, ativando fatores de transcrição ou inibindo proteínas, como o supressor de tumor (p53) (PENTICUFF *et al.*, 2019; SUMAIYA *et al.*, 2022). Foi primeiramente descrito como um fator proteico secretado por linfócitos ativados e nomeado pela sua capacidade em inibir a migração de macrófagos (BLOOM E BENNETT, 1966), no entanto, atualmente, sabe-se que MIF também pode ser secretado por outros tipos celulares (MERK *et al.*, 2012). Nesse sentido, Meyer-Siegler *et al.* (1998 e 2005) evidenciaram que MIF é produzido e expresso pelas células do epitélio glandular prostático e sua superexpressão ocorre em condições patológicas, como prostatite crônica e adenocarcinoma prostático metastático. Ainda, foi demonstrado em experimentos de cultura celular que ao inibir MIF há redução no crescimento de células metastáticas DU-145 (MEYER-SIEGLER *et al.*, 1996 e 2006). Então, de forma conjunta, MIF pode ser um regulador chave no desenvolvimento da próstata, já que atua em diversos processos proliferativos e necessários para tal.

Embora a expressão de MIF na próstata já tenha sido constatada, a sua relevância na glândula não é totalmente conhecida e tampouco há estudos para compreender as consequências da ausência de sua expressão na morfogênese dos órgãos do sistema reprodutor masculino. Considerando a importância da proliferação celular no desenvolvimento pós-natal da próstata e, sabendo que MIF interfere em vias de sinalização de proliferação e morte celular e, ainda tem sido associado ao desenvolvimento tumoral, faz-se necessário entender melhor a atividade biológica desta molécula na próstata. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar a próstata de camundongos MIF knockout no desenvolvimento púbere até a vida adulta, para compreender o papel dessa citocina no desenvolvimento da glândula.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estrutura, função e morfologia da próstata

A próstata é uma glândula exócrina túbulo-alveolar acessória do sistema reprodutor masculino que se localiza inferiormente à bexiga, anteriormente ao reto e envolve a uretra prostática, na qual os ductos secretam seus conteúdos (GINJA *et al.*, 2019; ITTMANN, 2018). É responsável por secretar um componente fluido e alcalino, que junto aos espermatozoides e

secreção de outras glândulas, irão compor o sêmen (ITTMANN, 2018; FRANCIS e SWAIN, 2018). É dividida em dois compartimentos principais: o epitélio, com a principal função glandular (produzir e secretar o fluido prostático) e o estroma, que garante o microambiente adequado para o compartimento epitelial. Esses compartimentos interagem entre si e se influenciam por meio de diferentes vias de sinalização para garantir o desenvolvimento e a homeostase prostática adequados (VERZE, CAI e LORENZETTI, 2016).

Essa glândula é um importante alvo de estudos, pois tem contribuição direta na oferta de condições adequadas para a fertilidade masculina, já que o fluido prostático contém uma série de fatores importantes para o sêmen, com grande relevância no sucesso reprodutivo (VERZE, CAI e LORENZETTI, 2016). Alguns desses componentes são íons, como zinco e citrato e proteínas, como fosfatase ácida prostática (PACp), β -microseminoproteína e antígeno prostático específico (PSA) (VICKMAN *et al.*, 2020). Além disso, a próstata é sítio para o desenvolvimento de condições benignas e malignas prevalentes como prostatite, hiperplasia prostática benigna (HPB) e câncer de próstata (AARON, FRANCO e HAYWARD, 2016; VERZE, CAI e LORENZETTI, 2016; GINJA *et al.*, 2019).

A próstata é uma estrutura compactada anatomicamente, constituída por diferentes zonas, as quais a nomenclatura consolidada foi estabelecida por John McNeal (1981): a zona periférica, a zona de transição e a zona central, as quais estão circundadas por uma zona de estroma fibromuscular (ITTMANN, 2018; GINJA *et al.*, 2019) (**Figura 1A**). A zona periférica, a porção mais externa e distal, constitui cerca de 70% do tecido da próstata, sendo o local de origem de grande parte dos cânceres de próstata. A zona de transição, próxima a uretra, corresponde em cerca de 5% do tecido em homens jovens, mas, em homens mais velhos, pode aumentar consideravelmente devido a HPB, condição que afeta tal zona. Além disso, a zona de transição também pode ser sítio do surgimento de cânceres, embora sejam clínica e biologicamente distintos daqueles originados na zona periférica. A zona central, em forma de cone, envolve os ductos ejaculadores e não é local de origem de processos patológicos, mas pode ser acometida, de forma secundária, por câncer (ITTMANN, 2018).

Em roedores, a próstata possui quatro lobos bilaterais distintos anatomicamente: lobo ventral, lobo lateral, lobo dorsal e lobo anterior (**Figura 1B**), sendo que os lobos laterais podem ser agrupados ao dorsal, denominando-se lobo dorsolateral (AARON, FRANCO e HAYWARD, 2016; SUGIMURA *et al.*, 1986). Eles são histologicamente distintos e classificados de acordo com a sua posição em relação a uretra prostática (**Figura 2**). O lobo ventral é uma estrutura localizada ventralmente e acima da uretra. O lobo dorsal está localizado

dorsalmente à uretra, sendo interligado de cada lado pelos lobos laterais. O lobo anterior, conhecido como glândula coaguladora, vinculado a curva menor das vesículas seminais, são alongados e tubulares (ITTMANN, 2018). Considerando que o lobo ventral é o mais responsivo a andrógenos (HO et al., 1985; HU *et al.*, 2021), e de ter muita semelhança à próstata humana, tanto em termos embrionários quanto histológicos (AARON, FRANCO e HAYWARD, 2016), ele é o mais empregado nos estudos investigativos moleculares e morfogênicos da próstata, como é o caso deste trabalho.

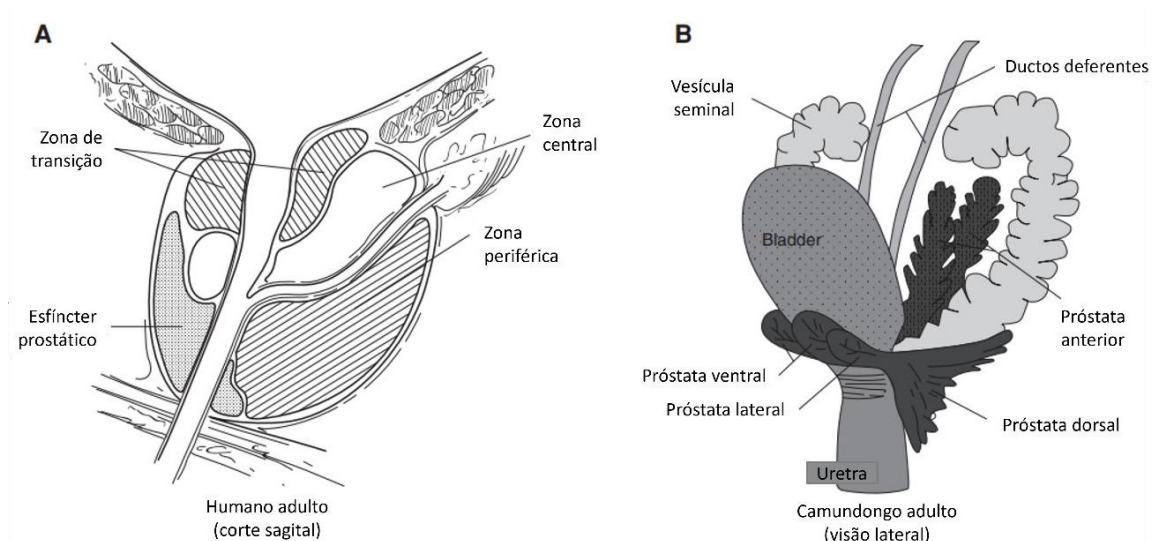


Figura 1: Ilustração esquemática da próstata de humanos e camundongos e estruturas adjacentes. (A) próstata humana mostrando a localização das três zonas prostáticas. (B) próstata de camundongo mostrando os diferentes lobos e sua relação às estruturas adjacentes. (Fonte: adaptada de ITTMANN, 2018).

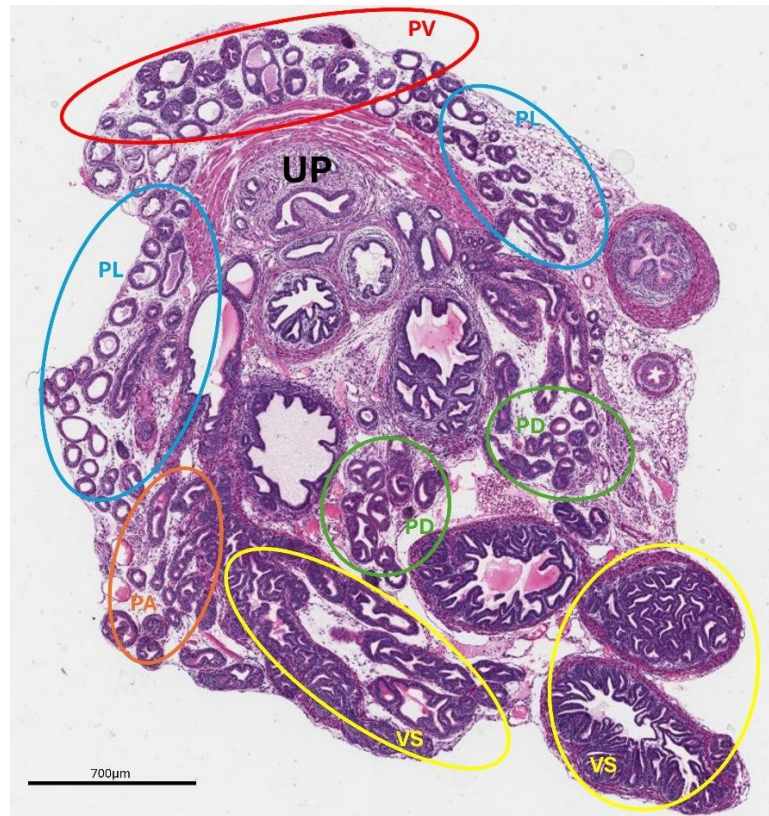


Figura 2: Lobos prostáticos em relação a uretra. A imagem é um corte histológico transversal da próstata de um camundongo C57BL-6/WT de 30 dias corado com Hematoxilina e Eosina (H&E). Os lobos prostáticos podem ser classificados de acordo com a posição em relação a uretra. UP: uretra prostática; PV: próstata ventral; PL: próstata lateral; PD: próstata dorsal; PA: próstata anterior; VS: vesícula seminal. (Fonte: da autora, 2025).

Cada lobo é composto por glândulas individuais, chamadas alvéolos ou ácinos e por ductos ramificados, os quais desembocam na uretra. Um tecido conjuntivo fibromuscular, denominado estroma, contendo fibroblastos, células musculares lisas, vasos sanguíneos, nervos, gânglios, macrófagos e mastócitos, separam os ácinos, sendo eles circundados por músculo liso (ITTMANN, 2018; GINJA *et al.*, 2019).

Tanto em humanos quanto em roedores adultos, o epitélio dos ductos prostáticos é constituído por células secretoras colunares luminais, células basais e raras células neuroendócrinas (MONTANO e BUSHMAN, 2017) (**Figura 3**). As células luminais são colunares, com citoplasma eosinofílico e núcleo circular basal e são especializadas na secreção de diversos produtos, como o PSA, contribuintes para a formação do fluido seminal. As células basais são adjacentes a membrana basal, possuem núcleo oval e citoplasma fracamente corado, podendo ser visualizadas por H&E (hematoxilina e eosina), porém, são mais bem identificadas por marcações de imuno-histoquímicas. As células neuroendócrinas, encontradas raramente, não podem ser identificadas por H&E, mas podem ser usados marcadores específicos por

imuno-histoquímica, para tal (ITTMANN, 2018). As células luminais são AR positivas e expressam citoqueratinas 8 e 18; as células basais expressam citoqueratina 5 e 14 e o fator de transcrição p63, as células neuroendócrinas são marcadas pela cromogranina A e sinaptofisina (FRANCIS e SWAIN, 2022).

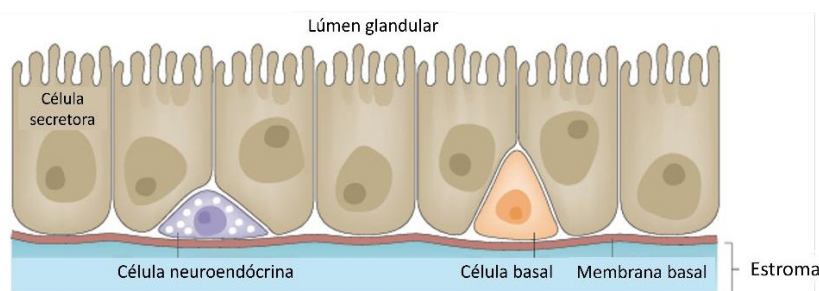


Figura 3: Células que compõem o epitélio prostático glandular: células secretoras luminais, células basais e células neuroendócrinas. (Fonte: adaptada de VERZE, CAI e LORENZETTI, 2016).

Os lobos possuem histologia e estrutura glandular distintas (SUGIMURA *et al.*, 1986; HAYWARD *et al.*, 1996). A próstata ventral, o maior lobo, possui ácinos de tamanhos variados, com poucas invaginações epiteliais, revestidos por células cúbicas, com citoplasma basofílico, núcleos basais, secreção serosa pálida ou floculenta e estroma fino. A próstata lateral tem ácinos maiores, revestidos por células cúbicas, com citoplasma basofílico, com núcleos basais, com poucas invaginações, estroma fibromuscular fino, secreção serosa eosinofílica, podendo ter aspecto floculento também. A próstata dorsal possui ácinos relativamente pequenos, revestidos por células colunares com núcleos centrais, citoplasma eosinofílico, invaginações, estroma mais espesso, secreção homogênea e ligeiramente eosinofílica. Por fim, a próstata anterior, também conhecida como glândula coaguladora, é revestida por epitélio de células cúbicas a colunares, com núcleo central, citoplasma granuloso e eosinofílico e padrão papilar (LEE *et al.*, 2011).

Portanto, é importante destacar que, mesmo que a próstata humana e a murina apresentem diferenças estruturais, anatômicas e histológicas consideráveis, elas desempenham um papel funcional semelhante na reprodução (RISBRIDGER *et al.*, 2005; ITTMANN, 2018). É por isso que a próstata de roedores é um modelo válido e consolidado para estudos clínicos e de doenças que afetam a próstata humana, como o câncer, porque, apesar das diferenças anatômicas, a carcinogênese prostática em ratos e humanos é controlada por mecanismos moleculares similares (GINJA *et al.*, 2019).

2.2 Desenvolvimento da próstata

A próstata se desenvolve a partir do UGS, estrutura formada pelo epitélio do seio urogenital (UGE) - derivado do endoderma, o qual é circundado pelo mesênquima do seio urogenital (UGM) – derivado do mesoderma (BUSKIN *et al.*, 2021). O UGS se diferencia ao longo do desenvolvimento, por meio de estímulo de andrógenos, até iniciar o processo de especificação prostático (HAYWARD e CUNHA, 2000; BUSKIN *et al.*, 2021). Nesse contexto, a próstata de roedores é um órgão que tem o seu desenvolvimento iniciado durante a embriogênese, mas tem uma importante fase de crescimento e maturação que acontece no período pós-natal (SUGIMURA *et al.*, 1986; SINGH, ZHU E HANDELSMAN, 1999). Em camundongos, a maior parte do crescimento e desenvolvimento da glândula se completa aos 60 dias de idade (AARON, FRANCO e HAYWARD, 2016; KAJIWARA *et al.*, 2020).

Então, o crescimento e o desenvolvimento da próstata se iniciam no período gestacional, a partir do UGS, com a formação de brotos. Sob estímulos androgênicos, os brotos se proliferam, formando cordões de células epiteliais que crescem e adentram o UGM, determinando a estrutura e a posição dos lobos que prevalecem na glândula adulta. Já no período pós-natal, os brotos começam a se alongar, depois se ramificam, canalizam e, em seguida, sofrem o processo de citodiferenciação (PRINS e PUTZ, 2008). As células epiteliais se diferenciam em células luminais secretoras e células basais, enquanto o mesênquima se diferencia em vários tipos de células, incluindo fibroblastos e células musculares lisas (BUSKIN *et al.*, 2021; FRANCIS e SWAIN, 2022). Ainda, encontram-se no epitélio da próstata as células neuroendócrinas, cuja origem ainda é debatida, mas a literatura tem demonstrado como sendo neurogênica, distinta das células basais e luminais, derivadas do seio urogenital (AUMÜLLER *et al.*, 1999). Com o estímulo androgênico, as células epiteliais se diferenciam e passam a expressar AR e sintetizam produtos de secreções lobo- e espécies-específicos (AARON, FRANCO e HAYWARD, 2016).

Cunha *et al.*, 2018 descreveram, nas três espécies - humanos, ratos e camundongos - o desenvolvimento da próstata em cinco principais estágios, os quais estão representados na figura de Buskin *et al.*, 2021 (**Figura 4**), sendo eles: pré-brotamento do UGS; brotamento do epitélio prostático a partir do UGE; alongamento e ramificação dos brotos; canalização dos cordões epiteliais; diferenciação das células epiteliais basais e luminais e citodiferenciação secretora (CUNHA *et al.*, 2018). O pré-brotamento é o período em que os testículos começam a secretar andrógenos, os ARs começam a ser expressos no UGM e na camada apical do UGE, seguido pelo brotamento inicial que é marcado por cordões sólidos do UGE, invadindo o UGM.

Os brotos vão se formando, se juntando e levam ao estabelecimento das subdivisões lobulares. Depois, os brotos começam a se alongar distalmente, a se ramificar e, ao mesmo tempo, a canalização ocorre, dando origem aos lumens, na direção proximal para distal, em relação a uretra (SINGH, ZHU E HANDELSMAN, 1999; VILAMAIOR *et al.*, 2006). Ocorre também a citodiferenciação das células epiteliais e mesenquimais, processo que envolve a interação entre UGM e UGE, além das células epiteliais neuroendócrinas que começam a se formar e alguns estudos hipotetizam que elas surgem a partir de células basais multipotentes (BUSKIN *et al.*, 2021).

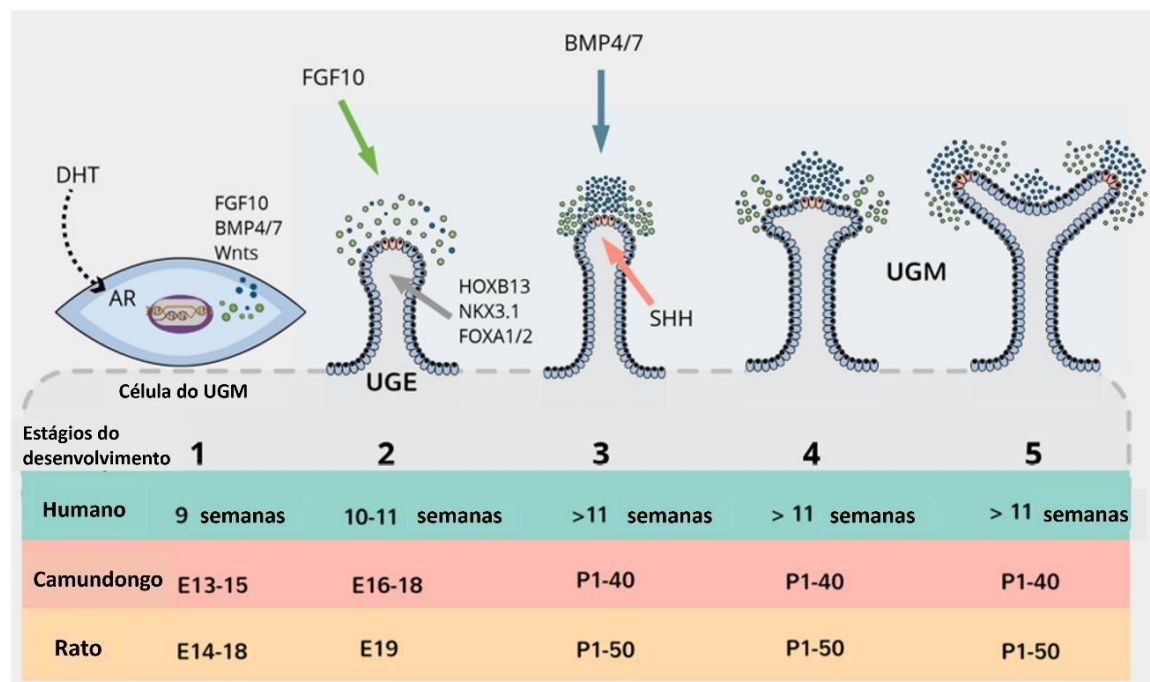


Figura 4: Desenvolvimento da próstata. 1: estágio de pré-brotamento; 2: brotamento inicial; 3: alongamento dos brotos; 4: morfogênese da ramificação; 5: ramificação e canalização ductal. E: dias de embrião; P: dias pós-natal (Fonte: adaptada de Buskin *et al.*, 2021).

De uma forma mais específica, em humanos, os estágios de organogênese da próstata, ocorrem durante o período gestacional, iniciando-se por volta da 8ª a 10ª semana, e se completam até o nascimento. Ao nascer, a próstata do indivíduo não sofre crescimento e se mantém até a puberdade, período em que completa a sua maturação e atinge uma maior complexidade, tornando-se uma glândula com ductos (OLIVEIRA *et al.*, 2016; CUNHA *et al.*, 2018; BUSKIN *et al.*, 2021). Já em camundongos, parte deles se iniciam pré-natalmente, sendo que o pré-brotamento ocorre por volta do 13º ao 15º dia embrionário e o brotamento do 16º ao 18º dia. Mas, o alongamento, a ramificação e a canalização ductal ocorrem pós-natalmente, do

nascimento até a puberdade. A canalização dos ductos ocorre simultaneamente ao alongamento dos brotos do 2 ao 15º dia pós-natal, sendo que a ramificação e o crescimento continuam até a 8ª semana (SINGH, ZHU E HANDELSMAN, 1999; BRUNI-CARDOSO e CARVALHO 2007). Além disso, os estágios de citodiferenciação epitelial e mesenquimal, os quais ocorrem concomitantemente, completando a maturação por volta de 60 dias pós-natal. Logo, estes processos dão origem às estruturas epiteliais secretoras maduras e envolvem numerosos genes e vias de sinalização celulares que os direcionam, como a via de sinalização do AR (ITTMANN, 2018; CUNHA *et al.*, 2018; BUSKIN *et al.*, 2021).

2.3 Sinalização androgênica e interação epitélio-estroma na próstata

A próstata é altamente dependente de andrógenos tanto para seu desenvolvimento quanto para manter a sua integridade estrutural e funcional (AARON, FRANCO e HAYWARD, 2016; VICKMAN *et al.*, 2020). Inclusive, na próstata adulta, a sinalização androgênica é responsável por manter a diferenciação epitelial e a secreção da glândula (FIANDALO *et al.*, 2018). Durante o desenvolvimento, os efeitos morfogênicos da próstata são mediados por essa sinalização via AR, os quais são expressos, desde as células do seio urogenital, nas células epiteliais e estromais (CUNHA *et al.*, 2018). A diferenciação sexual masculina, bem como o desenvolvimento e maturação da próstata, são determinados pelos andrógenos (AARON, FRANCO e HAYWARD, 2016), os quais são secretados pelas células de Leydig do testículo do embrião, sinalizando ao UGS para iniciar a especificação da próstata (BUSKIN *et al.*, 2021).

O principal andrógeno, a testosterona, é sintetizado principalmente pelas células de Leydig nos testículos, sob a regulação do hormônio luteinizante (LH). Depois de produzida, a testosterona circula ligada à globulina de ligação a hormônios sexuais (SHBG) ou à albumina, mas apenas a forma livre entra nas células prostáticas (TAN *et al.*, 2015). Dentro da célula, a testosterona é convertida em dihidrotestosterona (DHT) pela enzima 5- α -redutase, isso porque a DHT se liga ao receptor com mais afinidade do que a testosterona, principalmente devido a uma taxa de dissociação mais lenta (WILSON, GRIFFIN e RUSSELL, 1993; FIANDALO *et al.*, 2018), resultando em uma afinidade de duas a cinco vezes maior, o que eleva a sinalização do AR em dez vezes, quando comparada à testosterona (VICKMAN *et al.*, 2020). A DHT então se liga ao AR, que se transloca para o núcleo, modulando a transcrição gênica por meio da interação com elementos responsivos aos andrógenos. Isso leva à expressão de genes como

PSA e proteínas de vias de sinalização para a proliferação, crescimento e sobrevivência celular (TAN *et al.*, 2015; DAVEY e GROSSMANN, 2016) (**Figura 5**).

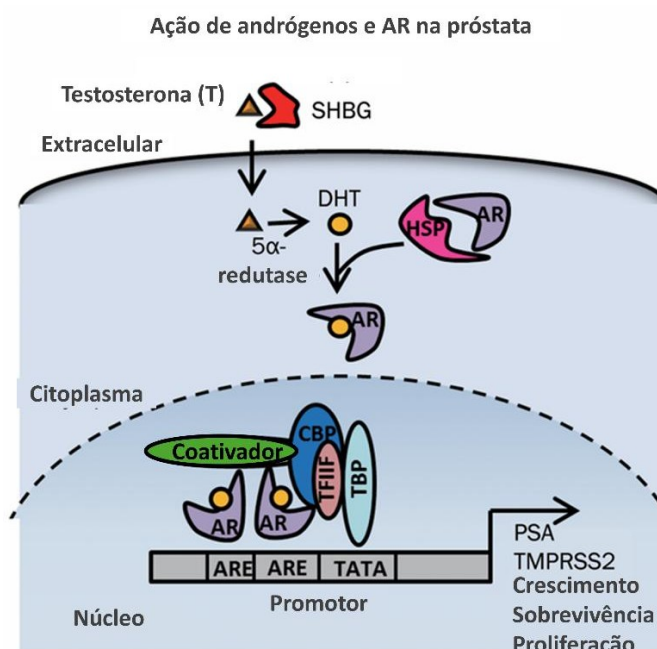


Figura 5: Sinalização de andrógenos e AR nas células prostáticas. Após a síntese testicular, a testosterona é transportada para tecidos-alvo, como a próstata, e convertida em diidrotestosterona (DHT) pela 5- α -redutase. O DHT se liga ao domínio de ligação do ligante e promove a dissociação das proteínas de choque térmico (HSPs) do AR. O AR então se transloca para o núcleo, dimeriza e se liga aos elementos de resposta aos andrógenos (ARE) na região promotora de genes-alvo, como o PSA e TMPRSS2. (Fonte: adaptada de TAN *et al.*, 2015).

No desenvolvimento fetal, antes e durante a formação dos brotos prostáticos, ARs são inicialmente detectados no UGM, mas não, ainda, no epitélio dos brotos em desenvolvimento, sugerindo-se que ARs estromais desempenham um papel fundamental nas fases iniciais do desenvolvimento prostático (CUNHA, COOKE e KURITA, 2004). São os sinais indutivos dependentes de andrógenos provenientes do mesênquima do UGS que direcionam o processo geral de desenvolvimento (SINGH *et al.*, 2014). Sabe-se que durante o brotamento e a ramificação prostáticos, já se tem uma sinalização androgênica importante, na qual os andrógenos secretados pelos testículos do embrião, interagem com AR expresso no UGM e na camada apical do UGE. E assim, ao decorrer dos estágios do desenvolvimento, essa sinalização se mantém, sendo que o brotamento inicial se relaciona a um período de altos níveis de andrógenos, enquanto o alongamento, ramificação e canalização ocorrem durante um período de baixos níveis androgênicos (BUSKIN *et al.*, 2021). A expressão de AR no epitélio surge mais tarde, após o mesênquima, como pode ser observado na figura 6, mas já pode ser detectada

em camundongos por volta do 18º dia embrionário, quando os brotos epiteliais começam a se formar. Durante o desenvolvimento, a sinalização do AR epitelial se intensifica à medida que os brotos crescem e se ramificam (VICKMAN *et al.*, 2020) (**Figura 6**).

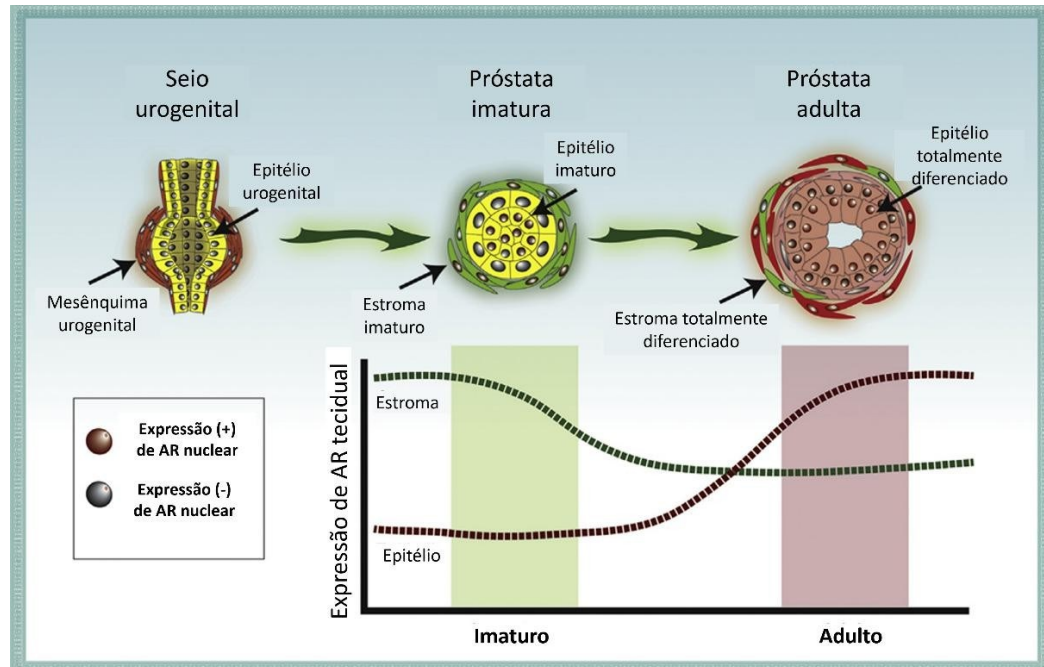


Figura 6: A expressão do receptor androgênico (AR) nos tipos celulares prostáticos durante o desenvolvimento. O desenvolvimento prostático é iniciado com o desenvolvimento de um seio urogenital (UGS), seguido pela extensão dos brotos prostáticos, formando uma glândula prostática imatura. A glândula prostática adulta contém compartimentos estromais e epiteliais totalmente diferenciados, que formam um órgão maduro e funcional. O AR é inicialmente expresso apenas em uma proporção do mesênquima do seio urogenital (UGM). As células epiteliais ganham a expressão do AR durante todo o desenvolvimento. Embora apenas um subconjunto de células estromais (por exemplo, fibroblastos e células musculares lisas) mantenham a expressão do AR na próstata adulta, praticamente todas as células epiteliais lumbinais expressam o AR. (Fonte: adaptada de VICKMAN *et al.*, 2020).

Já é consolidado que o desenvolvimento prostático é resultante de interações celulares recíprocas, nas quais o UGM induz a diferenciação epitelial prostática, e o epitélio prostático induz a organização e a diferenciação da musculatura lisa no UGM (CUNHA, 2008; SINGH *et al.*, 2014; VICKMAN *et al.*, 2020). A ativação do AR é responsável por mediar a produção de fatores de crescimento de atuação parácrina, nas células epiteliais (CUNHA, 1972 e 2008). O UGM induz o epitélio prostático a formar brotos e cordões sólidos que crescem, ramificam-se e canalizam-se, resultando em um epitélio caracterizado pela diferenciação em células lumbinais colunares intercaladas por células basais na membrana basal. Simultaneamente à diferenciação epitelial, as células mesenquimais dispersas se diferenciam, formando músculo liso adjacente ao epitélio. De fato, as células epiteliais têm um importante papel nesse processo, visto que

elas, e não as mesenquimais, é que determinam o padrão das camadas de músculo liso (SINGH *et al.*, 2014; SANCHES *et al.*, 2021).

Por conseguinte, a sinalização androgênica e a interação epitélio-estroma são essenciais no desenvolvimento da próstata, sendo que o AR estromal é crucial para a proliferação e diferenciação das células epiteliais durante o desenvolvimento normal, enquanto a expressão de AR epitelial é indispensável para a diferenciação do mesênquima e para as funções diferenciadas da glândula (VICKMAN *et al.*, 2020). Além disso, a transição do crescimento prostático para uma fase estável, na próstata adulta, é regulada por um equilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular, sendo controlada pela sinalização androgênica, tanto no estroma quanto no epitélio (FIANDALO *et al.*, 2018; VICKMAN *et al.*, 2020).

2.4 Vias de sinalização proliferativas e o desenvolvimento da próstata

Além do estímulo androgênico, outras vias de sinalização são importantes para o desenvolvimento prostático, como a das MAPKs, que, podem ativar ERK1/2, tendo um papel na proliferação celular, diferenciação, migração, senescência e apoptose (RUBINFELD e SEGER, 2005; ROSKOSKI, 2012; SUN *et al.*, 2015). A ERK1/2 é uma proteína importante para a ramificação dos ductos prostáticos (ZHANG *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2021). Foi visto que andrógenos são capazes de estimular a expressão e secreção de FGF10 (fator de crescimento de fibroblastos 10), o qual ativa a cascata de sinalização RAS/MEK/ERK, aumentando a atividade de MLCK (quinase de cadeia leve da miosina) que leva a fosforilação de MLC (cadeia leve da miosina), a qual tem papel central na proliferação celular, divisão e migração (HU *et al.*, 2021) (**Figura 7**). Ainda, quando a cascata MEK/ERK está ativada, ela pode atuar na fase de brotamento da próstata (HU *et al.*, 2021).

O Wnt (*Wingless-Int-1*), uma grande família de 19 glicoproteínas já identificadas, é um outro grupo morforregulatório importante para o desenvolvimento da próstata. Essas moléculas podem se ligar aos receptores de superfície celular Fzd (Frizzled) nos tecidos-alvo, iniciando cascatas de sinalização celulares (HUANG *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2021). Há dois mecanismos principais pelos quais diferentes proteínas de Wnt podem atuar: a via canônica, que envolve a proteína β -catenina, e a via não canônica, independente da β -catenina (ALLGEIER *et al.*, 2008). Os Wnts canônicos sinalizam através da β -catenina nuclear/Tcf-Lef, enquanto os Wnts não canônicos sinalizam por cascatas alternativas, como Ca^{2+} /PKC, RhoA/JNK ou RhoB/Rab4 ou

ainda por reguladores extracelulares que antagonizam as ações dos Wnt canônicos (HUANG *et al.*, 2009).

Dentre essas proteínas, o Wnt5a é a expressa em maior quantidade no UGS de camundongos machos durante o brotamento (ZHANG *et al.*, 2006) e ela está vinculada à via não canônica (ALLGEIER *et al.*, 2008). Durante o desenvolvimento da próstata, o Wnt5a pode modular o brotamento, interferindo no posicionamento e no tamanho dos brotos; na ramificação, inibindo o crescimento ductal e os pontos de ramificação, além de influenciar na proliferação epitelial; na polaridade celular e na formação do lúmen (ALLGEIER *et al.* 2008; HUANG *et al.* 2009) - eventos que acontecem (parte deles), pós natalmente, até os 40 dias, em camundongos (BUSKIN *et al.*, 2021). Mais do que isso, o Wnt5a interage com outros genes morforregulatórios em uma rede complexa de sinalização, controlando a morfogênese de ramificação e a maturação glandular (HUANG *et al.*, 2009). Uma via de sinalização com destaque é a da proteína Rho, que dependente de Wnt como ligante, sendo um mecanismo crucial na regulação da morfogênese de ramificação da próstata (HU *et al.*, 2021) (**Figura 7**).

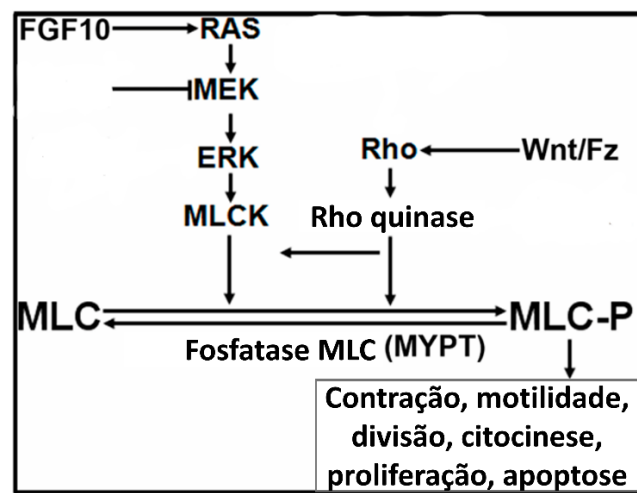


Figura 7: Vias da regulação da morfogênese de ramificação da próstata. A MLC-P desempenha um papel central na proliferação celular, divisão e migração, e a MLCK é uma quinase dedicada à fosforilação de MLC. A ativação de Ras pelo FGF10 aumenta a atividade da MLCK por meio da ERK ativada pela MEK, que fosforila a MLCK. A Rho, em contraste, aumenta a MLC-P fosforilando e inativando a subunidade de direcionamento da MYPT, que desfosforila a MLC-P. (Fonte: adaptada de HU *et al.*, 2021).

2.5 MIF: função, mecanismo de ação e associação a vias proliferativas

MIF é uma proteína multifuncional pleiotrópica que atua como uma citocina pró-inflamatória e tem um papel fundamental na imunidade inata e adaptativa (CALTABIANO *et*

al., 2021; ANAHARA *et al.*, 2006). Primeiramente foi descrito como um produto secretado apenas por células T, mas já se sabe que ele pode ser secretado por outros tipos celulares, incluindo células do sistema imune, as epiteliais, as endoteliais, as parenquimatosas e as cancerosas, tendo, assim, um papel central na resposta imunológica (MERK *et al.*, 2012). Ele pode ativar macrófagos, aumentando a aderência, fagocitose e atividade antitumoral dessa célula, induzindo a produção de óxido nítrico. MIF também tem um papel inflamatório sistêmico e local, visto que pode ser liberado por monócitos/macrófagos em resposta a glicocorticoides, os quais tem seus efeitos imunossupressores regulados, induzindo a produção de outras citocinas inflamatórias (NISHIHARA, 2000). Além do papel na inflamação e na imunidade, MIF é essencial na proliferação celular e na diferenciação (NISHIHARA, 2000), tanto é que tem sido mostrado superexpresso em diversos tipos de malignidades, sendo que sua expressão se correlaciona com a progressão da doença (JANKAUSKAS *et al.*, 2019). Já foi descrito que ele estimula a migração e a proliferação de células musculares lisas (KASAMA *et al.*, 2010) e reduz a apoptose e o estresse oxidativo neuronal (BAE *et al.*, 2020).

MIF é secretado por diferentes tipos celulares e interage com diversos receptores, o que explica a sua ampla e variável função biológica (FARR, GHOSH e MOONAH, 2020). De fato, ele pode atuar por diversos mecanismos de ação e exercer suas funções biológicas de forma autócrina e parácrina, por meio dos receptores CD74, CXCR2, CXCR4 e CXCR7 (**Figura 8**) (SUBBANNAYYA *et al.*, 2016; JANKAUSKAS *et al.*, 2019; NOE e MITCHELL, 2020). MIF se liga ao CD74, com alta afinidade, que recruta os receptores CD44 ou CXCR, podendo formar vários complexos, como CD74/CD44 (**Figura 8B**), CD74/CXCR2 ou CD74/CXCR4 (**Figura 8C**) e CD74/CXCR4/CXCR7 (**Figura 8D e 8E**) (JANKAUSKAS *et al.*, 2019; PENTICUFF *et al.*, 2019; (NOE e MITCHELL, 2020; SUMAIYA *et al.*, 2022). Ainda não é bem estabelecido se o CD44 pode se associar a esses complexos (JANKAUSKAS *et al.*, 2019). O CD74 é uma proteína de transmembrana tipo II, que contém uma cauda citosólica N-terminal, uma região transmembrana curta e uma longa região extracelular C-terminal. Ele é expresso nas APCs (células apresentadoras de antígenos), como células dendríticas e macrófagos, podendo se ligar a MHCII (complexo principal de histocompatibilidade classe II) (FARR, GHOSH e MOONAH, 2020). Ao se ligar em seus receptores nas células-alvo, MIF exerce sua ação ativando cascatas de sinalização que regulam a transcrição gênica, tendo a expressão de moléculas efetoras. (LENG *et al.* 2003).

A sinalização de MIF via CD74/CD44 envolve a fosforilação de resíduos de serina nas caudas citoplasmáticas do CD74 e do CD44, seguida pelo recrutamento de uma tirosina quinase

não receptora, a SRC (tirosina-quinase proto-oncogênica) (SUBBANNAYYA *et al.*, 2016), que ativa diversas vias de sinalização, como a da MAPK, a da quinase fosfatidilinositol 3 (PI3K) ou a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (JANKAUSKAS *et al.*, 2019; NOE e MITCHELL, 2020) (**Figura 8B**). Ainda, MIF pode atuar por vias independentes de receptor, por exemplo, quando atravessa a membrana celular e se liga a proteína 1 de ligação ao domínio de ativação JUN (JAB1) (**Figura 8A**), que ativa o fator de transcrição ativador de proteína 1 (AP-1), ou inibe p53 (PENTICUFF *et al.*, 2019). Essas vias desempenham papéis cruciais em processos celulares, como inflamação, proliferação celular, sobrevivência celular e regulação do metabolismo energético. Por exemplo, quando MIF ativa a via MAPK/ERK1/2, ele induz proliferação celular e inibe apoptose (FARR, GHOSH e MOONAH, 2020). Sendo assim, pelo fato de MIF ser expresso em diversos órgãos como no cérebro, olhos, ouvidos, pulmões, mama, sistema endócrino, fígado, ovários, trato gastrointestinal, rins, pele, ossos, articulações testículos e próstata, ele pode desencadear a ativação dessas várias cascatas nesses alvos (CALANDRA e ROGER 2003).

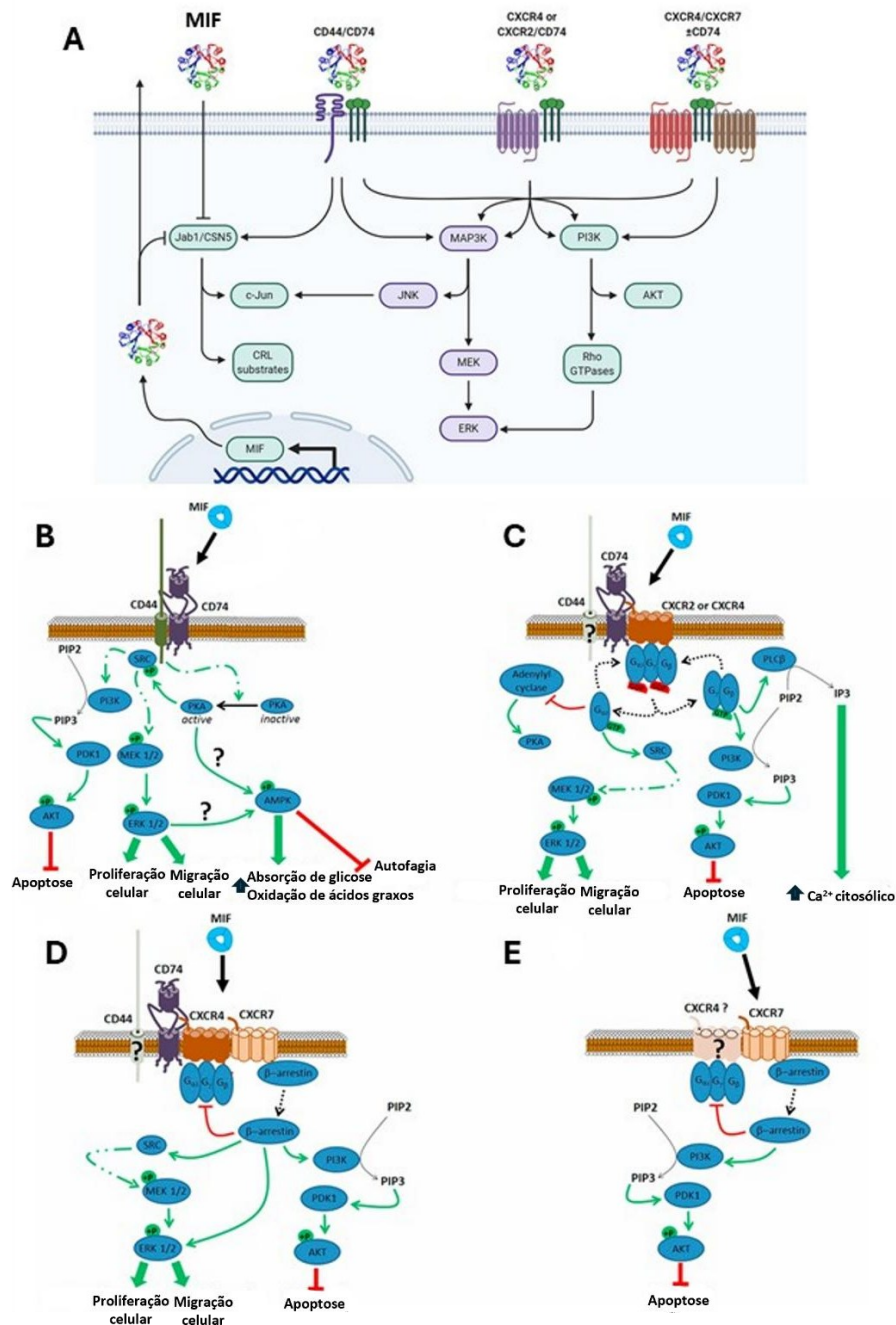


Figura 8: Mecanismos da sinalização de MIF. (A) MIF extracelular, de forma parácrina/autócrina, ou MIF produzido endogenamente no citosol, interage com Jab1/CSN5 no citosol, resultando na degradação diferencial de substratos da ligase cullina-ring (CRL) pelo proteassoma e/ou fosforilação de c-Jun/ativação de AP-1. MIF extracelular interage independentemente com CD74 em um heterocomplexo com CD44, CXCR2, CXCR4 e/ou CXCR7 para iniciar as vias efetoras *downstream* de MAPK e/ou PI3K. (B) A sinalização do MIF pode ser desencadeada pela interação com CD74 na superfície celular, que requer a interação com CD44, o que ativa PKA como primeiro passo, que fosforila SRC e inicia as vias ERK1/2 e PI3K-AKT ou também fosforila AMPK. (C) MIF também é capaz de se ligar ao CXCR2 ou CXCR4, mas uma interação física entre CD74 e CXCR2 ou CXCR4 é necessária para a transdução de sinal do MIF. Uma via clássica de proteína G acoplada é então desencadeada, resultando na estimulação das cascatas de sinalização ERK1/2, PI3K-AKT e PLC-beta. (D) Oligomerização de CXCR4 com CXCR7, sendo que o CXCR4 se liga ao CD74 e o CXCR7 recruta beta-arrestina-2, que inibe a sinalização de proteínas G ocupando seu local de ligação no CXCR4. Além disso, a beta-arrestina-2 atua como uma plataforma ativadora para SRC, ERK1/2 e PI3K. (E) MIF induz PI3K-AKT, ligando-se ao complexo CXCR4/CXCR7. (Fonte: adaptada de NOE e MITCHELL, 2020 – (A) e JANKAUSKAS *et al.*, 2019 – (B, C, D e E)).

2.6 MIF e sua expressão na próstata

A expressão de MIF na próstata foi comprovada por imuno-histoquímica e ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática), mostrando que essa citocina está presente em diferentes amostras prostáticas, incluindo linhagens celulares normais e de adenocarcinoma. Foi evidenciado que MIF é produzido e expresso pelas células do epitélio glandular prostático, bem como o seu receptor CD74, e que essa expressão varia conforme o estágio de desenvolvimento e o estado de doença (MEYER-SIEGLER e HUDSON, 1996; MEYER-SIEGLER, ICZKOWSKI e VERA, 2005).

Já tem sido comprovado que MIF tem um papel biológico na próstata, como já evidenciado que há sua superexpressão em condições patológicas, como prostatite crônica e adenocarcinoma prostático metastático (MEYER-SIEGLER e HUDSON, 1996; MEYER-SIEGLER, ICZKOWSKI e VERA, 2005), podendo este fator ser um bom marcador de prognóstico tumoral (MEYER-SIEGLER e HUDSON, 1996; MEYER-SIEGLER *et al.*, 2007). Ainda, amostras de pacientes com câncer de próstata apresentam maiores níveis séricos de MIF do que pacientes normais. Linhagens celulares LNCaP e PC-3 (de câncer de próstata) secretam MIF em maior quantidade comparado a linhagens normais (MEYER-SIEGLER, ICZKOWSKI e VERA, 2005) e este fator secretado pode regular a função dos macrófagos e a produção de citocinas (MEYER-SIEGLER e HUDSON, 1996). Ele contribui para o crescimento e desenvolvimento tumoral, visto que induz aumento da neoangiogênese e do ciclo celular e inibe a função pró-apoptótica e também a expressão de p53, estando associado com a incidência e recidiva do câncer de próstata, uma vez que pode iniciar e fosforilar MAPK/ERK1/2 e escapar da morte celular (MEYER-SIEGLER *et al.*, 2007).

Por todas essas questões, MIF pode ser um marcador de risco no câncer prostático e terapias que o tenham como alvo podem ser importantes estratégias terapêuticas (MEYER-SIEGLER *et al.*, 2007). Nesse sentido, vários estudos, resumidos no trabalho de PENTICUFF *et al.* (2019), têm utilizado estratégias experimentais, como deleção, inibição ou modificação estrutural de MIF, a fim de avaliar seus possíveis efeitos terapêuticos, considerando as consequências dessa proteína nas condições citadas (PENTICUFF *et al.*, 2019). Embora seja consolidado que MIF está relacionado a condições patológicas na próstata e que ele é capaz de ativar ou inibir vias de sinalização envolvidas em eventos proliferativos e apoptóticos, ainda não há evidências do papel deste fator no desenvolvimento e na manutenção da estrutura prostáticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel do MIF no desenvolvimento púbere da próstata de camundongos com uso de modelo knockout nas idades de 30 e 60 dias.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o peso corporal e prostático de camundongos MIF^{-/-};
- Estudar a morfologia geral da próstata ventral de camundongos MIF^{-/-};
- Avaliar o papel de MIF na proliferação celular nas fases púbere a adulta do desenvolvimento da próstata;
- Investigar o compartimento estromal (células musculares lisas, fibras colágenas, fibroblastos) na ausência de MIF;
- Quantificar os níveis de testosterona séricos em camundongos MIF^{-/-} em comparação ao selvagem;
- Entender o papel de MIF na sinalização androgênica da próstata;
- Compreender a influência de MIF na expressão de proteínas de vias de sinalização para o desenvolvimento e proliferação celular na próstata (AR, WNT5a e ERK1/2).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

20 camundongos machos C57BL/6 WT (tipo selvagem) e 20 camundongos machos MIF^{-/-} (MIF knockout) foram 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 (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) até atingirem as idades de 30 e 60 dias. Assim, 4 grupos foram formados nesse estudo: 2 grupos WT-camundongos selvagens com 30 e 60 dias de idade (WT30; WT60) e 2 grupos knockouts- MIF^{-/-} com 30 e 60 dias de idade (MIF^{-/-}30; MIF^{-/-}60). Seguindo o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), os animais foram anestesiados com cetamina 50% e xilazina 2% na proporção de 1:1 (0,2 mL/100g) por via i.p. (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008), pesados e, em seguida, eutanasiados pela coleta de sangue por punção cardíaca

ventricular. A próstata foi retirada e pesada. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFU (protocolo 30/21).

4.2 Análise histológica e estereológica

A próstata de 16 animais ($n = 4$ por 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 para secção (4µm) em micrótomo rotativo (Leica). O sangue retirado dos animais ($n=4$ /grupo), após a eutanásia, foi centrifugado a 3200 rpm por 15 minutos a 4°C e, em seguida, o plasma foi separado e congelado.

Cortes histológicos da próstata foram desparafinizados com xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool e em água e, em seguida, corados com H&E e Picrosirius - hematoxilina para quantificação de colágeno. As lâminas foram digitalizadas usando o Scanner de lâminas com software Aperio ImageScope 12.4.6 (Leica Biosystems®) e capturados com ampliação de 40X. 10 imagens foram analisadas por corte histológico, sendo três animais/grupo. Foi utilizado 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 tocava o epitélio, lúmen, estroma e colágeno, foi contado e os dados foram expressos como uma porcentagem da área total (frequência relativa).

4.3 Imuno-histoquímica

Nos cortes histológicos da próstata de todos os grupos ($n = 4$ por grupo) foi realizada a recuperação antigênica 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 durante a noite, a 4°C, com anticorpos primários: α -actina, vimentina, PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), WNT5a e AR, diluídos em BSA 3% (os anticorpos e suas diluições estão representados na tabela 1). Os complexos antígeno-anticorpo foram detectados pelos reagentes prontos para uso da Vector® (amplificador de cabra anti-camundongo e *impress* HRP (peroxidase endógena) de cavalo anti-cabra - MP-7405) e da Biocare® (rabbit HRP-polymer - RMR622) seguido de reação/coloração DAB (antígeno de adesão derivado de células) da Biocare® e contracoloração de hematoxilina (por 8 segundos).

A frequência relativa de células musculares lisas e de fibroblastos 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 com o número de núcleos positivos para PCNA dividido pelo total de núcleos celulares e expresso como uma porcentagem (frequência relativa de células positivas para PCNA). A quantificação de WNT5a foi realizada utilizando o método de *H-score*, quantificando a intensidade (0 = nula; 1 = fraca; 2 = moderada; 3 = forte) e a porcentagem de células positivas e o AR foi quantificado pelo método de *score*, avaliando apenas a porcentagem de células positivas no citoplasma e no núcleo. A porcentagem de células positivas foi classificada em *scores*, sendo 0 = células positivas menor que 5%; 1 = 5 a 25%; 2 = 26 a 50%; 3 = 51 a 75%; e 4 = mais que 76% (RAMOS *et al.* 2015).

4.4 Western blotting

A próstata de 24 animais foi congelada em nitrogênio líquido logo após a coleta do material e, depois, a - 80°C. O tecido foi processado para a extração de proteínas, sendo que, para os grupos de 30 dias, cada amostra (n = 4 por grupo) continha um pool de duas próstatas e para os grupos de 60 dias, cada amostra (n = 4 por grupo) era composta por uma próstata. Foi realizada a homogeneização dos tecidos em tampão para ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA *buffer* - R0278, Sigma Aldrich®) com inibidores de proteases - coquetel de inibidores de proteases - Sigma Aldrich - P8340®, acrescido de fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) e inibidor de fosfatases – ortavanadato de sódio (Na₃VO₄). O homogeneizado foi centrifugado a 18800g a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante foi congelado e depois utilizado para a quantificação de proteínas totais em cada amostra, pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Após a dosagem de proteínas totais do homogeneizado de tecido, alíquotas contendo 20µg de proteína, preparadas com tampão de amostra, foram separadas por *SDS-PAGE* em gel de poliacrilamida TRIS-glicina 10% e eletrotransferidas sobre membranas de nitrocelulose. Os sítios de ligação de proteínas inespecíficas foram bloqueados com BSA 5% diluída em TBST a 0,2% por 1 hora em temperatura ambiente. As membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com os anticorpos primários para pERK1/2, ERK1/2, diluídos em BSA 3% (os anticorpos estão especificados na tabela 1). No dia seguinte foram incubadas com anticorpos secundários anti-coelho-HRP 1:1000, diluídos em BSA 3% com TBST, por 1 hora em temperatura ambiente. Os componentes imunorreativos foram revelados pelo kit de detecção ECL (GE HealthCare®) e a quimioluminescência foi detectada em um fotodocumentador Amersham

Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences®). As bandas de proteína foram quantificadas pelo software Image J. Os valores de densitometria de ERK 1/2 fosforilada foram normalizados em relação ao total de ERK 1/2.

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados nos ensaios de imuno-histoquímica e *western blotting*.

	Anticorpo	Diluição (anticorpo:BSA 3%)	Marca	Código
Imuno-histoquímica	Camundongo anti- α -actina	1:100	Santa Cruz Biotechnology	Sc-32251
	Camundongo anti-vimentina	1:100	Santa Cruz Biotechnology	Sc-6260
	Camundongo anti-PCNA	1:100	Santa Cruz Biotechnology	Sc-56
	Coelho anti-AR	1:10	Sigma Aldrich	Sab 1306176
	Camundongo anti-Wnt5a	1:30	Santa Cruz Biotechnology	Sc-365370
Western - <i>blotting</i>	Coelho anti-pERK (p-p44/42)	1:300	Cell Signaling	4370
	Coelho anti-ERK (p44/42)	1:800	Cell Signaling	9102

4.5 Quantificação de testosterona

Utilizando-se amostras de plasma de quatro camundongos de cada grupo WT e MIF^{-/-} de 30 e 60 dias, foi realizada a quantificação de testosterona com o kit ELISA de testosterona (Cayman® 582701), seguindo as instruções do fabricante. A sensibilidade mínima do teste foi de 6pg/mL. Com o auxílio de um espectrofotômetro de microplaca, foi verificada a quantidade de testosterona pelo comprimento de onda de 412nm.

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo software BioEstat® versão 5.3. Os dados foram testados para distribuição normal usando o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados foram avaliados com ANOVA one-way seguido de pós-testes de Tukey (para os dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (para os não paramétricos). Valores com diferença estatística significativa foram aqueles com $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 A ausência de MIF provoca menor peso corporal e maior peso da próstata associado a maiores níveis de testosterona

Ao longo do desenvolvimento, de 30 para 60 dias, observamos que há um ganho de peso corporal e peso da próstata em ambos os grupos, mas em MIF^{-/-} acontece de forma desacelerada. Aos 60 dias, animais MIF^{-/-} apresentam menor peso corporal e, aos 30 dias, apresentam maior peso de próstata e, consequentemente, peso relativo da próstata. Da fase púbere para a fase adulto, há um aumento natural nos níveis séricos de testosterona nos animais selvagens. No entanto, no grupo MIF^{-/-} a testosterona já se encontra precocemente elevada na idade de 30 dias, sendo bem maior que em WT30 (Tabela 2).

Tabela 2: Dados biométricos de peso corporal, peso da próstata e dosagem sérica de testosterona de camundongos selvagem (WT) e MIF^{-/-} nas idades de 30 e 60 dias. Média $\pm$ desvio padrão.

Grupos	WT30	MIF ^{-/-} 30	WT60	MIF ^{-/-} 60
Peso corporal (g)	16,259 $\pm$ 1,28	17,123 $\pm$ 4,44	25,608 $\pm$ 1,260 #	23,335 $\pm$ 1,850 *#
Peso da próstata (g)	0,023 $\pm$ 0,006	0,039 $\pm$ 0,015 *	0,068 $\pm$ 0,015 #	0,060 $\pm$ 0,016 #
Peso relativo da próstata (%)	0,140 $\pm$ 0,0004	0,220 $\pm$ 0,0004 *	0,260 $\pm$ 0,0007	0,250 $\pm$ 0,0007 #
Níveis de testosterona (pg/ml)	145,5 $\pm$ 30,34	782,2 $\pm$ 516,27 *	1517,4 $\pm$ 1823,6 #	388,74 $\pm$ 98,105

*Diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparados grupos de mesma idade. # Diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparadas idades do mesmo grupo.

5.2 A histoarquitetura da próstata é influenciada por MIF

Os resultados estereológicos dos animais selvagens mostram que ocorrem alterações nos compartimentos epitelial e estromal, ao passo que, ocorre um aumento de lúmen entre as idades de 30 e 60 dias. Comparando-se os grupos, MIF^{-/-} de 30 dias apresenta menor área epitelial e de estroma muscular e maior amplitude luminal, em cerca de 100% (**Figura 9 A-E**). Ou seja, na ausência de MIF, há a antecipação de alterações que seriam encontradas na fase adulto.

5.3 MIF tem papel no desenvolvimento estromal, modulando a organização de células musculares lisas e deposição de colágeno

Aos 30 dias, animais MIF^{-/-} apresentam redução na distribuição de colágeno, resultado que foi encontrado somente na idade de 60 dias nos animais selvagens (**Figura 9 F-J**). Para

saber se essa alteração estava relacionada a alguma alteração no número de fibroblastos, analisamos a distribuição dessas células no estroma, mas nenhuma alteração foi observada no grupo MIF^{-/-} em relação ao WT (**Figura 10 A-E**).

Ainda, avaliamos se MIF teria alguma influência na formação do estroma muscular da próstata. No curso do desenvolvimento prostático dos animais WT, observa-se uma redução de músculo liso e nos animais MIF^{-/-}30 há uma menor quantidade dessas células em comparação ao WT de mesma idade (**Figure 10 F-J**).

5.4 A proliferação celular na próstata é reduzida com o knockout de MIF

A proliferação celular é intensa no desenvolvimento púbere da próstata, reduzindo 72% no grupo WT e 92% no grupo MIF^{-/-} até a fase adulta (**Figura 11 E**). Nos animais MIF^{-/-} a proliferação celular é menor do que nos selvagens, tanto na idade de 30 quanto de 60 dias (**Figura 11 A-E**).

Para saber se essa influência na proliferação celular estava relacionada à via ERK, analisamos a sua ativação por western blotting. Os resultados mostram que os níveis de fosforilação de ERK 1/2 é maior no grupo MIF^{-/-} de 30 dias em relação ao selvagem (**Figura 11 F e G**). Portanto, é provável que outras sinalizações devem ser responsáveis por tal redução na proliferação.

Analisando outra proteína que estimula a proliferação na próstata, o AR, notamos que na fase púbere a localização citoplasmática é maior do que a nuclear (localização ativa do receptor), invertendo essa relação na idade adulta, onde o estímulo androgênico é mais elevado. Os resultados mostraram que o Score de AR nuclear na próstata é significativamente maior em MIF^{-/-}30 (**Figura 12 A-E**), demonstrando que não é o AR o responsável pela redução da proliferação celular na próstata.

Por fim, decidimos avaliar o conteúdo de WNT5a, que também tem influência na proliferação celular, e demonstramos que há expressão na próstata na fase púbere, sendo que o Score aumenta até a idade adulta nos animais selvagens. O Score de marcação de WNT5a é significativamente maior nos animais MIF^{-/-} de 30 dias em comparação ao selvagem (**Figura 12 F-J**).

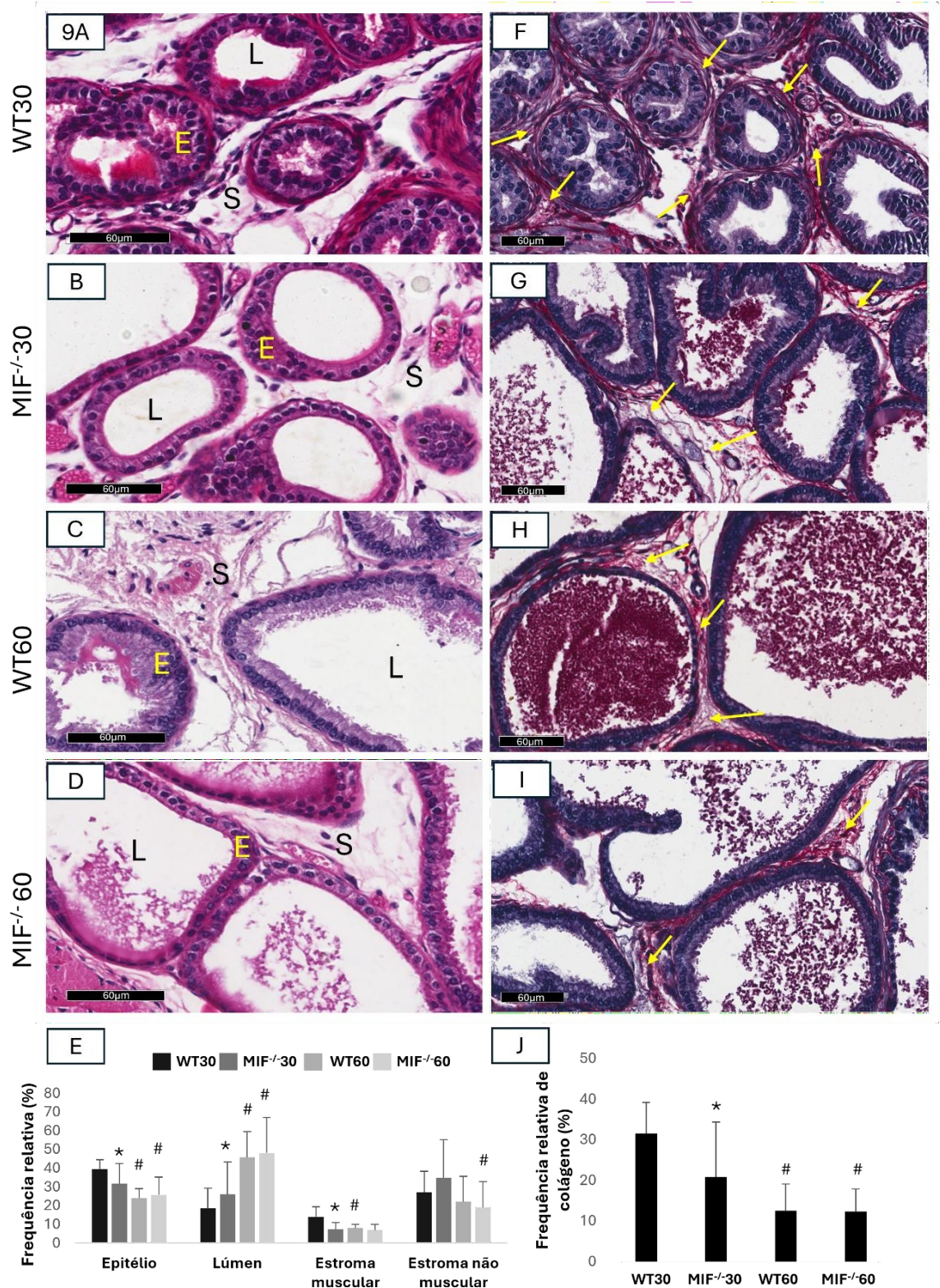


Figura 9: Cortes histológicos da próstata ventral de camundongos selvagens (WT) e MIF^{-/-} nas idades de 30 e 60 dias coradas com hematoxilina e eosina (A-D) e picrossirius-hematoxilina (F-I). Epitélio (E), lúmen (L), estroma (S) e fibras colágenas (setas amarelas). O desenvolvimento da fase púber para a fase adulta é evidenciado pela expansão dos ácinos secretórios devido ao maior aumento do lúmen e pela redução do estroma muscular. Os animais MIF^{-/-} com 30 dias de idade apresentam redução da área epitelial e aumento do lúmen em comparação aos camundongos WT. Fibras colágenas também estão reduzidas no grupo MIF^{-/-}30. E e J: Representação gráfica da frequência relativa (média±desvio padrão) do epitélio, lúmen, estroma muscular e estroma não muscular e colágeno. * Diferença estatística ($p < 0,05$) ao comparar grupos da mesma idade. # Diferença estatística ($p < 0,05$) ao comparar idades do mesmo grupo. Barra de escala: 60 μ m.

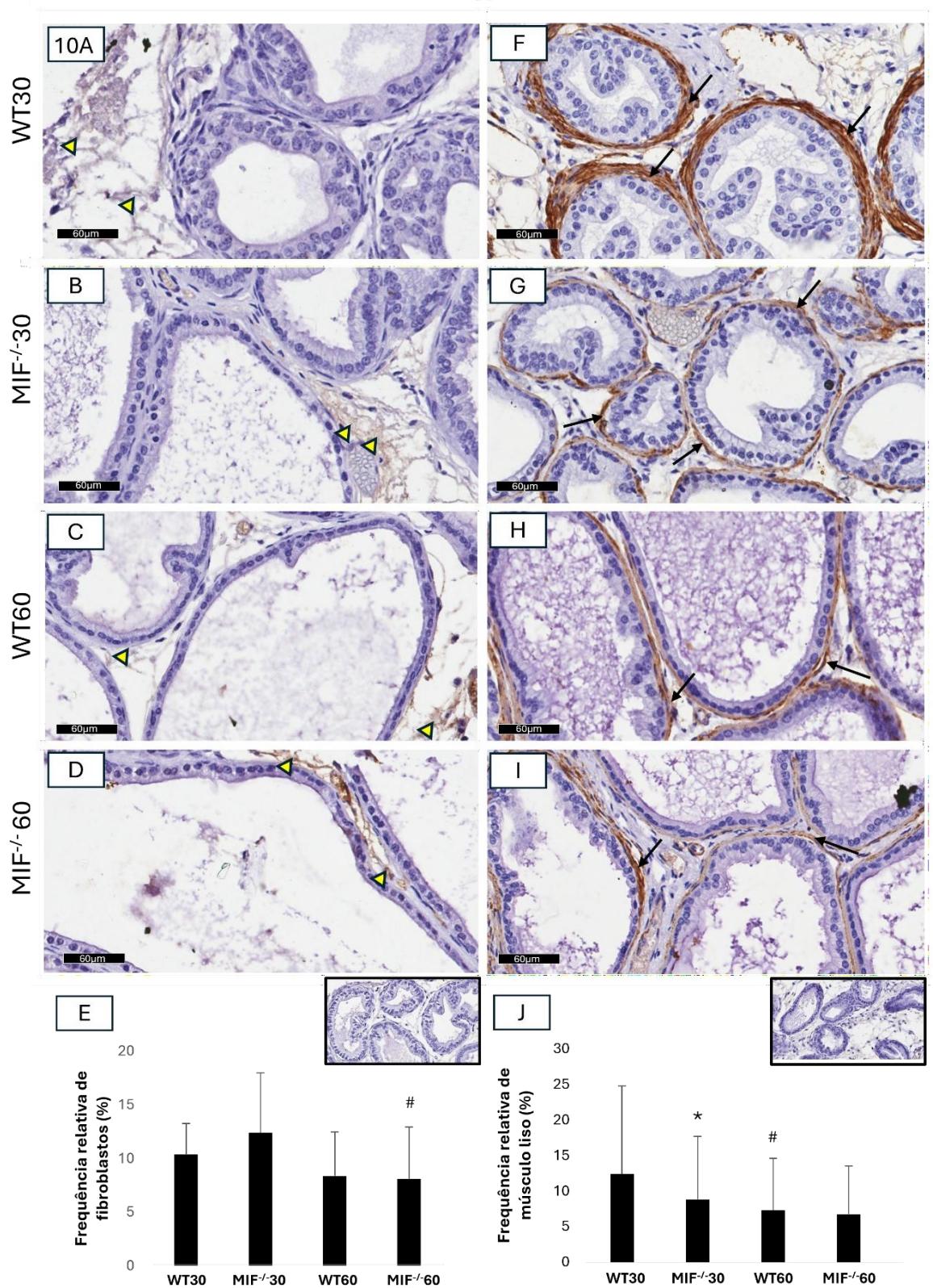


Figura 10: Avaliação dos fibroblastos e células musculares lisas na próstata ventral de camundongos selvagens (WT) e MIF^{-/-} nas idades de 30 e 60 dias. A-D: Imunohistoquímica para vimentina mostra fibroblastos no estroma da próstata (cabeças de seta amarela). F-I: Imunohistoquímica para α -actina mostra uma diminuição nas células musculares lisas (setas pretas) durante o desenvolvimento da próstata em camundongos WT e no grupo MIF^{-/-}30. A frequência relativa (média $\pm$ desvio padrão) de fibroblastos e células musculares lisas é representada em E e J, respectivamente. * Diferença estatística ($p < 0,05$) ao comparar grupos da mesma idade. # Diferença estatística ($p < 0,05$) ao comparar idades do mesmo grupo. Barra de escala: 60 μ m.

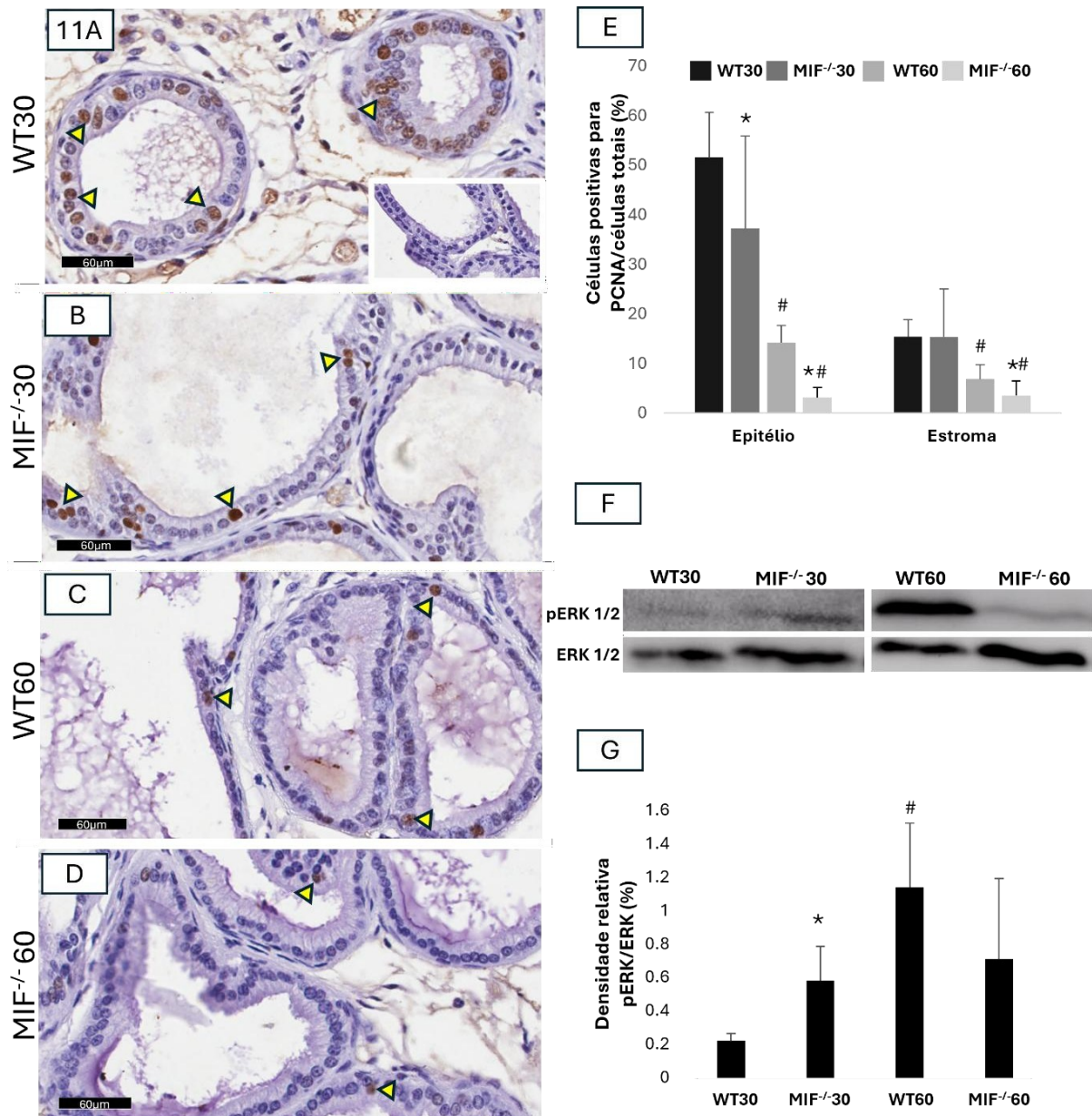


Figura 11: Análise das células em proliferação e *western blotting* de ERK na próstata ventral de camundongos selvagens (WT) e MIF^{-/-} nas idades de 30 e 60 dias. A-D: Imunohistoquímica para PCNA mostra células em proliferação (cabeças de seta amarelas) cuja quantidade normalmente diminui durante o desenvolvimento da próstata, mas apresenta uma redução precoce no grupo MIF^{-/-}30. E: Representação gráfica (média±desvio padrão) da frequência relativa de PCNA na próstata. F: *Western blotting* para ERK 1/2 fosforilada e total. G: Representação gráfica dos níveis relativos (média±desvio padrão) de pERK mostra um aumento na ativação de ERK durante o desenvolvimento da próstata em camundongos WT e no grupo MIF^{-/-} com 30 dias. * Diferença estatística ($p < 0,05$) ao comparar grupos da mesma idade. # Diferença estatística ($p < 0,05$) ao comparar idades do mesmo grupo. Barra de escala: 60 μ m.

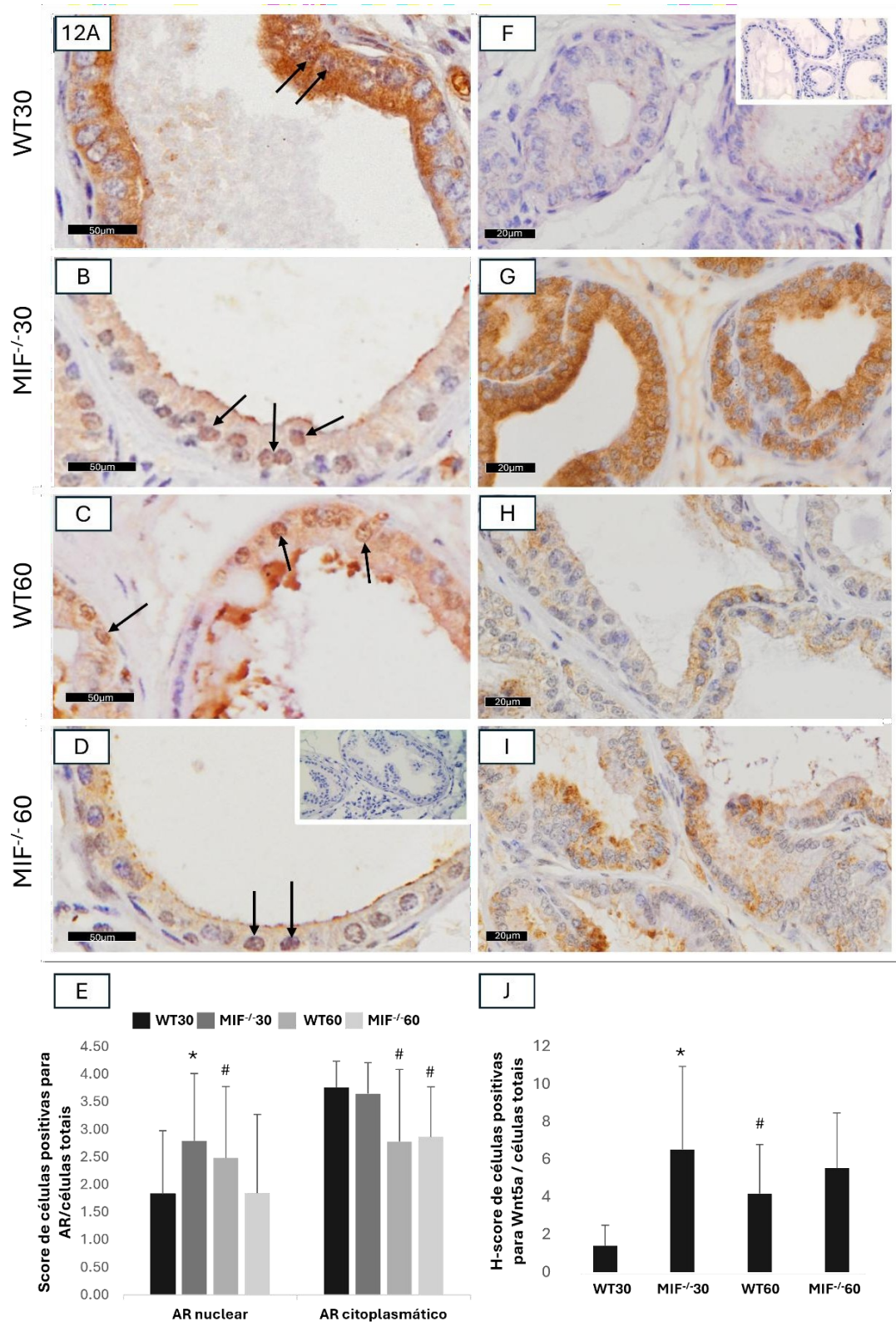


Figura 12: Análise do conteúdo de AR e Wnt5a por imunohistoquímica na próstata ventral de camundongos selvagens (WT) e MIF^{-/-} nas idades de 30 e 60 dias. A-D: Imunohistoquímica para AR mostra intensa marcação citoplasmática e baixa marcação nuclear (setas pretas) no grupo WT30. Essa relação é invertida aos 60 dias de idade. O grupo MIF^{-/-}30 exibiu um grande aumento na localização nuclear de AR. F-I: Imunohistoquímica para Wnt5a mostra sua localização citoplasmática no epitélio acinar da próstata, apresentando um aumento no grupo WT60 e ainda mais pronunciado no grupo MIF^{-/-}30. E e J: Representação gráfica (média±desvio padrão) do Score de AR e H-Score de Wnt5a. * Diferença estatística ($p<0,05$) ao comparar grupos da mesma idade. # Diferença estatística ($p<0,05$) ao comparar idades do mesmo grupo. Barra de escala: 50 μ m (A-D) e 20 μ m (F-I).

6 DISCUSSÃO

MIF é uma citocina multifuncional e pleiotrópica com influência em vários mecanismos morfológicos, fisiológicos, patológicos e moleculares em diferentes órgãos e tecidos (CALTABIANO *et al.*, 2021). Desde sua descoberta em 1966 (BLOOM e BENNETT, 1966) tem sido o tema de inúmeros estudos, e sua expressão foi demonstrada em células de diferentes tecidos além daquelas do sistema imunológico (JANKAUSKAS *et al.*, 2019). Meyer-Siegler e colegas (1998), foram os primeiros a demonstrar que o epitélio glandular da próstata expressa MIF. Desde então, estudos têm se concentrado em desvendar o papel do MIF em condições patológicas, como o câncer de próstata, com o bloqueio do MIF sendo considerado uma alternativa terapêutica devido à sua superexpressão no adenocarcinoma (PENTICUFF *et al.*, 2019; MEYER-SIEGLER e HUDSON, 1996; MEYER-SIEGLER *et al.*, 2005). No entanto, nenhuma investigação avaliou o papel dessa citocina na próstata em condições não patológicas ou no desenvolvimento glandular. Este é o primeiro estudo a descrever alterações na próstata da fase púbere até a adulta, utilizando o modelo de MIF knockout, e a elucidar se essa citocina interfere na organização morfológica e atividades moleculares que permeiam o desenvolvimento da próstata.

Ao longo do desenvolvimento puberal, em ambos os grupos, há ganho de peso corporal, no entanto, esse ganho é menor no animal MIF^{-/-}. O mesmo resultado foi encontrado em um estudo de Serre-Beinier *et al.* (2010) onde o ganho de peso corporal foi menor em camundongos MIF^{-/-} até os 2 meses de idade. Ainda, vimos que na idade adulta o animal MIF^{-/-} apresenta menor peso corporal em relação ao animal selvagem. Na literatura é discutido que animais MIF^{-/-} podem apresentar hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina, características que interferem no metabolismo e, consequentemente, no peso do animal (GLIGOROVSKA *et al.*, 2019). Embora não tenhamos avaliado o estado metabólico dos animais, nossos resultados estão de acordo com a literatura e apontam o envolvimento de MIF na manutenção do controle do peso corporal.

Nosso estudo mostrou que, embora o ganho de peso corporal seja menor nos animais knockout, o peso da próstata é mais elevado na idade púbere. Esse achado foi acompanhado com uma elevação nos níveis de testosterona. Isso indica que a maior androgenização aos 30 dias pode ter sido responsável pelo efeito anabolizante na próstata na idade púbere em MIF^{-/-}. A testosterona (T) é um andrógeno de grande importância na regulação funcional e de crescimento da próstata (SCHALKEN, 2005). Ao longo do desenvolvimento, é esperado um aumento nos níveis circulantes desse andrógeno durante a puberdade, o que é de extrema

importância para a manutenção das atividades da próstata na fase adulta (CUNHA *et al.*, 2018). No entanto, o que encontramos em MIF^{-/-} foi um pico muito elevado de T seguido de um acentuado declínio entre a fase púbere e adulta. Tal declínio reverteu na fase adulta o efeito anabolizante que a testosterona teve na próstata do grupo MIF^{-/-}30. Poucos estudos avaliaram a relação entre os níveis séricos de T e MIF. Anahara e colaboradores (2006) demonstraram que as células de Leydig testiculares apresentam alta expressão de MIF e influência na esteroidogênese. Ainda, eles mostraram que camundongos MIF^{-/-} de 80 dias de idade apresentam reduzidos níveis de T e estradiol intratesticulares. Assim, embora a redução de T só tenha acontecido nos animais MIF^{-/-}30, eles corroboram a literatura e mostram que MIF, através da sua relação com os níveis séricos de T, tem influência no anabolismo de tecidos andrógeno-dependentes, como a próstata.

A próstata é uma glândula cujo desenvolvimento começa na vida embrionária, mas continua na vida pós-natal, com o crescimento se estendendo até a maturidade sexual quando a arquitetura glandular é estabelecida (CUNHA *et al.*, 1987). Em roedores, os brotos prostáticos pós-natal se alongam, ramificam, canalizam e então se diferenciam entre a 2^a e 3^a semana, se tornando madura até os 2 meses de vida (BRUNI-CARDOSO e CARVALHO, 2007; BUSKIN *et al.*, 2021). Nossos resultados histológicos e estereológicos mostram que entre as idades de 30 e 60 dias há um crescimento natural da glândula, marcado pela redução da área epitelial associada à expansão do lúmen e redução do estroma muscular. Nos animais MIF^{-/-}30 essas alterações já são notadas, demonstrando uma antecipação do desenvolvimento glandular na fase puberal. O epitélio é responsável por secretar o fluido prostático e o compartimento estromal tem como função providenciar um microambiente apropriado para o epitélio, fornecendo sinais para manter a glândula em homeostase (VERZE *et al.*, 2016). Nesse contexto, uma vez que a ausência de MIF antecipa o desenvolvimento da próstata, demonstramos que essa citocina tem relevância para os eventos pós-natal que promovem a histoarquitetura da próstata.

O estroma da próstata é formado por células e matriz extracelular rica em colágeno e vasos sanguíneos. Ele é um ambiente importante por exercer papel regulatório no controle da morfogênese glandular pós-natal e manutenção da função reprodutiva adulta (CUNHA *et al.* 1996; RICHARDS *et al.*, 2019). Avaliando o ambiente estromal, encontramos que o knockout de MIF causa uma redução nas células musculares lisas na fase púbere. As células musculares lisas, além de providenciar a contração para a função reprodutiva da glândula, são responsáveis por secretar fatores de crescimento que inibem a proliferação excessiva e participam de interação parácrina com o epitélio, conhecida como interação epitélio-estroma (THOMSON *et*

al. 2008). Embora os efeitos de MIF nas células musculares da próstata ainda não sejam descritos, estudos mostram que MIF estimula a proliferação de células musculares lisas vasculares de pulmão, levando, por exemplo, a hipertrofia (ZHANG *et al.*, 2012). Dessa forma, sem o seu estímulo nos animais knockout, sua redução é esperada.

Além das células musculares lisas, os fibroblastos também são células importantes para o funcionamento estromal na produção dos elementos da matriz extracelular (OWEN, CLAYTON e PEARSON *et al.*, 2022). Embora nosso estudo não tenha encontrado qualquer alteração na quantidade de fibroblastos, houve uma redução na deposição de colágeno na ausência de MIF. O colágeno é produzido por fibroblastos no estroma da próstata e tem importante função no suporte estrutural que ajuda na organização e integridade das estruturas glandulares (DI CARLO e SORRENTINO, 2024). Notamos que na próstata juvenil o estroma é marcado por grande quantidade de colágeno e então ele se reduz na puberdade até a vida adulta. Na ausência de MIF, tal redução já é notada na próstata púbere, sendo provável que MIF tenha mais efeito no estímulo à síntese de colágeno do que na quantidade de fibroblastos. Nesse sentido, já foi demonstrado que a presença de MIF no meio de cultura aumenta a produção de colágeno, enquanto sua ausência tem efeito contrário (NINGYAN *et al.*, 2015). Ainda, estudos apontam MIF como alvo para tratar algumas condições fibróticas. Por exemplo, no estudo de Luo *et al.* (2021), foi evidenciado que a inibição específica de MIF pode contribuir para o tratamento da fibrose pulmonar por meio da redução na sinalização de TFG- β 1/SMADs. Assim, fica evidente que MIF tem efeito no estroma da próstata, influenciando não só o conteúdo de células musculares lisas, mas também na produção de colágeno e sua ausência antecipa o amadurecimento estromal puberal da próstata. Esses elementos são importantes para a interação epitélio-estroma, contratilidade e correta estrutura que suporta os ácinos secretores na vida adulta.

O AR, é o grande estimulador da sinalização androgênica em resposta aos andrógenos disponíveis na glândula, sendo essencial para a organogênese e funcionalidade da função secretora da próstata (TABOGA *et al.*, 2009; TAN *et al.*, 2015; BUSKIN *et al.*, 2021). A ligação de andrógenos no AR no citoplasma causa sua ativação e translocação para o núcleo, levando à expressão de genes para a secreção da glândula e proteínas de vias de sinalização para a proliferação e sobrevivência celular que atuam tanto no epitélio quanto no estroma da glândula (DAVEY e GROSSMANN, 2016). No estroma, os ARs estão expressos também nas células musculares lisas e a sua ativação é responsável por mediar a produção de fatores de crescimento de atuação parácrina, nas células epiteliais (CUNHA, 1972 e 2008). Nossos resultados sobre

AR mostram que no início da puberdade a localização do AR é mais citoplasmática e no início da fase adulta há um aumento da marcação nuclear, o que indica maior ativação do receptor, fase em que os níveis de T se elevam em condições normais. No entanto, nos animais MIF^{-/-}30 há um aumento de AR nuclear que se relaciona também com o aumento de T precoce que esse grupo apresentou. Assim, a antecipação do amadurecimento glandular notado na ausência de MIF na fase púber é provavelmente uma resposta morfológica à maior androgenização que o organismo está recebendo.

Ao avaliar a marcação de PCNA, nosso estudo demonstrou que em animais MIF^{-/-} há redução da proliferação celular. A proliferação celular é um evento fundamental no desenvolvimento prostático. De acordo com Vilamaior *et al* (2006) durante o desenvolvimento da próstata existem 2 picos de proliferação celular que acontecem aos 14 dias (quando o epitélio está em expansão pelo processo de ramificação ductal) e outro na sexta semana pós-natal (que é marcado pela diferenciação celular e secreção). Já é bem descrito na literatura que MIF é uma citocina chave na regulação da proliferação celular em diversos tecidos (PENTICUFF *et al.*, 2019). Embora não existam estudos específicos da proliferação na próstata de animais MIF knockout, muitos trabalhos mostram esse efeito no câncer, uma vez que MIF é superexpresso na maioria dos tumores (MEYER-SIEGLER e HUDSON, 1996; MEYER-SIEGLER *et al.*, 2005; KINDT *et al.*, 2016; NOE e MITCHELL, 2020). A ação proliferativa de MIF foi descrita *in vitro* em células hepáticas e um efeito antiproliferativo ocorre em hepatocarcinoma de animais MIF^{-/-} (WIRTZ *et al.*, 2021). O knockout de MIF em camundongos transplantados com tumor de mama também apresenta redução na proliferação celular (CHARAN *et al.*, 2020). Pela primeira vez, demonstramos que na próstata MIF tem efeito importante no controle da proliferação que acontece na fase juvenil do desenvolvimento, uma vez que a sua ausência reduz significativamente o index proliferativo da glândula. Assim, qualquer alteração na sinalização MIF nos estágios pós-natal pode ter efeito no correto crescimento e diferenciação epitelial da próstata.

MIF exerce seu efeito por meio de seu receptor cognato (CD74) que após a sua ativação recruta o CD44 e, subsequentemente, medeia a transdução de sinal por meio de várias vias de sinalização proliferativas como PI3K/AKT, ERK, entre outras (BIFULCO *et al.*, 2008). Surpreendentemente, nosso estudo mostrou um aumento na ativação de ERK 1/2 na próstata de animais MIF^{-/-} púberes, mostrando que a redução da proliferação celular não ocorre pela inibição dessa sinalização. Ao estudar o conteúdo de Wnt5a na próstata encontramos também um aumento da expressão dessa proteína em animais MIF^{-/-}30. A sinalização de WNT ocorre

por três diferentes vias intracelulares: a via canônica WNT/ β -catenina e duas vias não canônicas, desempenhando papel na proliferação celular, diferenciação e migração em diversos órgãos e sistemas (PAK *et al.* 2019). O WNT5a é um membro da família gênica Wnt cuja expressão é importante para o desenvolvimento da próstata, sendo encontrado desde os primeiros dias pós-natal (PAKULA *et al.*, 2017). Embora o WNT5a seja mais frequentemente associado à via não canônica, ele também tem a capacidade de inibir a via canônica, que é mediada pela β -catenina, apresentando efeito promotor ou supressor de tumores no controle da proliferação (THIELE *et al.*, 2015). Alguns estudos mostram que o WNT5a regula negativamente a proliferação e a migração de células da papila dental humana, células tumorais de fígado e cólon (PENG *et al.*, 2009; CHENG *et al.*, 2014; YANG *et al.* 2015). Na próstata, já foi demonstrado que o WNT5a atua reduzindo a proliferação na próstata neonatal em microambientes ricos em glicose (CASSIMIRO *et al.* 2020). Dessa forma, o maior conteúdo de WNT5a na próstata nos animais MIF^{-/-} na fase púbere, através da uma supressão da via canônica proliferativa, pode ser a via responsável pela redução do efeito proliferativo nesses animais. Logo, sugerimos que MIF tem atuação na proliferação celular da próstata através da regulação da via não canônica de WNT5a.

7 CONCLUSÃO

A ausência de MIF leva ao aumento da androgenização da próstata e antecipa o amadurecimento epitelial, luminal e estromal que normalmente ocorreria apenas no início da fase adulta. Além disso, o MIF desempenha um papel no controle adequado da proliferação celular por meio da modulação negativa de WNT5a. Assim, MIF parece ser um regulador chave no controle temporal das mudanças morfológicas prostáticas.

REFERÊNCIAS

- AARON, L.; FRANCO, O. E.; HAYWARD, S. W. Review of prostate anatomy and embryology and the etiology of benign prostatic hyperplasia. **Urology Clinics of North America**, v. 43, n. 3, p. 279-288, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2016.04.012>.
- ALLGEIER, S. H. *et al.* WNT5A selectively inhibits mouse ventral prostate development. **Dev Biol**, v. 324, n. 1, p. 10-17, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.08.018>.
- ANAHARA, R. *et al.* Deletion of macrophage migration inhibitory factor gene induces down regulation of sex hormones and ultrastructural abnormalities in mouse testes. **Reprod Toxicol**, v. 21, n. 2, p. 167-170, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.08.001>.
- AUMÜLLER, G. *et al.* Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. **Urology**, v. 53, n. 5, p. 1041-1048, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(98\)00631-1](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(98)00631-1).
- BAE, S. H. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor mediates macrophage migration inhibitory factor to protect neurons against oxygen-glucose deprivation. **Neural Regeneration Research**, v. 15, n. 8, p. 1483-1489, ago. 2020. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.274340>.
- BIFULCO, C.; MCDANIEL, K.; LENG, L.; BUCALA, R. Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 36, p. 3790-3801, 2008. <https://doi.org/10.2174/138161208786898608>.
- BLOOM, B. R.; BENNETT, B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. **Science**, v. 153, n. 3731, p. 80-82, 1966. <https://doi.org/10.1126/science.153.3731.80>.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- BRUNI-CARDOSO, A.; CARVALHO, H. F. Dynamics of the epithelium during canalization of the rat ventral prostate. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 290, n. 10, p. 1223-1232, 2007. <https://doi.org/10.1002/ar.20591>.
- BUSKIN, A. *et al.* A Review of Prostate Organogenesis and a Role for iPSC-Derived Prostate Organoids to Study Prostate Development and Disease. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 23, p. 13097, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms222313097>.
- CALANDRA, T.; ROGER, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 791-800, 2003. <https://doi.org/10.1038/nri1200>.
- CALTABIANO, R. *et al.* Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) and Its Homologue d-Dopachrome Tautomerase (DDT) Inversely Correlate with Inflammation in Discoid Lupus Erythematosus. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 184, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26010184>.
- CASSIMIRO, I. S.; CRUZ, A. R.; BOSQUE, B. P.; *et al.* Rat postnatal prostate development is impaired by in vitro high-glucose environment. **Reproduction**, v. 160, n. 3, p. 469-480, 2020. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0091>.

CHARAN, M.; DAS, S.; MISHRA, S.; CHATTERJEE, N.; VARIKUTI, S.; KAUL, K.; MISRI, S.; AHIRWAR, D. K.; SATOSKAR, A. R.; GANJU, R. K. Macrophage migration inhibitory factor inhibition as a novel therapeutic approach against triple-negative breast cancer. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 9, p. 774, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02992-y>.

CHENG, R. *et al.* Wnt5a suppresses colon cancer by inhibiting cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition. **J Cell Physiol**, v. 229, n. 12, p. 1908-1917, 2014. <https://doi.org/10.1002/jcp.24566>.

CUNHA, G. R. Epithelio-mesenchymal interactions in primordial gland structures which become responsive to androgenic stimulation. **Anat Rec**, v. 172, n. 2, p. 179-195, 1972. <https://doi.org/10.1002/ar.1091720206>.

CUNHA, G. R. *et al.* Development of the human prostate. **Differentiation**, v. 103, p. 24-45, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2018.08.005>.

CUNHA, G. R. Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p. 578-586, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2008.00290.x>.

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, 2004. <https://doi.org/10.1679/aohc.67.417>.

CUNHA, G. R.; DONJACOUR, A. A.; COOKE, P. S.; *et al.* The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocrine Reviews**, v. 8, n. 3, p. 338-362, 1987. <https://doi.org/10.1210/edrv-8-3-338>.

CUNHA, G. R.; HAYWARD, S. W.; DAHIYA, R.; FOSTER, B. A. Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. **Acta Anatomica**, v. 155, n. 1, p. 63-72, 1996. <https://doi.org/10.1159/000147791>.

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

DI CARLO, E.; SORRENTINO, C. The multifaceted role of the stroma in the healthy prostate and prostate cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 22, n. 1, p. 825, 2024. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05564-2>

FARR, L.; GHOSH, S.; MOONAH, S. Role of MIF Cytokine/CD74 Receptor Pathway in Protecting Against Injury and Promoting Repair. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1273, 2020. Publicado em 23 jun. 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01273>.

FIANDALO, M. V.; STOCKING, J. J.; POP, E. A.; *et al.* Inhibition of dihydrotestosterone synthesis in prostate cancer by combined frontdoor and backdoor pathway blockade. **Oncotarget**, v. 9, n. 13, p. 11227-11242, 2018. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24107>.

FRANCIS, J. C.; SWAIN, A. Prostate Organogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 8, n. 7, p. a030353, 2018. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030353>.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Manual de utilização de animais/fiocruz**. Rio de Janeiro: Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação (CEUA), 2008.

GINJA, M.; PIRES, M. J.; GONZALO-ORDEN, J. M. *et al.* Anatomy and imaging of rat prostate: practical monitoring in experimental cancer-induced protocols. **Diagnostics (Basel)**, v. 9, n. 3, p. 68, 2019. <https://doi.org/10.3390/diagnostics9030068>.

GLIGOROVSKA, L.; BURSAĆ, B.; KOVAČEVIĆ, S.; VELIČKOVIĆ, N.; MATIĆ, G.; DJORDJEVIC, A. Mif deficiency promotes adiposity in fructose-fed mice. **Journal of Endocrinology**, v. 240, n. 2, p. 133-145, 2019. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0333>.

HAYWARD, S. W. *et al.* Smooth Muscle-Epithelial Interactions in Normal and Neoplastic Prostatic Development. **Acta Anatomica**, v. 155, p. 63-72, 1996. <https://doi.org/10.1159/000147791>.

HAYWARD, S. W.; CUNHA, G. R. The prostate: development and physiology. **Radiol Clin North Am**, v. 38, n. 1, p. 1-14, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0033-8389\(05\)70146-9](https://doi.org/10.1016/S0033-8389(05)70146-9).

HO, S. M.; DAMASSA, D.; KWAN, P. W.; SETO, H. S.; LEAV, I. Androgen receptor levels and androgen contents in the prostate lobes of intact and testosterone-treated Noble rats. **Journal of Andrology**, v. 6, p. 279-290, 1985. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1985.tb00846.x>.

HU, W. Y. *et al.* Morphometric analysis of rat prostate development: roles of MEK/ERK and Rho signaling pathways in prostatic morphogenesis. **Biomolecules**, v. 11, n. 12, p. 1829, 2021. <https://doi.org/10.3390/biom11121829>.

HUANG, L. *et al.* The role of Wnt5a in prostate gland development. **Dev Biol**, v. 328, n. 2, p. 188-199, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.01.003>.

ITTMANN, M. Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 8, n. 5, p. a030346, 2018. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030346>.

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

KAJIWARA, S. *et al.* Castration-induced stromal remodeling disrupts the reconstituted prostate epithelial structure. **Lab Investigation**, v. 100, p. 670-681, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0352-4>.

KASAMA, T. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor: a multifunctional cytokine in rheumatic diseases. **Arthritis**, v. 2010, p. 106202, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/106202>.

KINDT, N.; JOURNE, F.; LAURENT, G.; SAUSSEZ, S. Involvement of macrophage migration inhibitory factor in cancer and novel therapeutic targets. **Oncology Letters**, v. 12, n. 4, p. 2247-2253, 2016. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4929>.

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, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2011.05.012>.

LENG, L. *et al.* MIF signal transduction initiated by binding to CD74. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 11, p. 1467-1476, 2003. <https://doi.org/10.1084/jem.20030286>.

LUO, Y.; YI, H.; HUANG, X.; *et al.* Inhibition of macrophage migration inhibitory factor (MIF) as a therapeutic target in bleomycin-induced pulmonary fibrosis rats. **American Journal of Physiology - Lung Cell and Molecular Physiology**, v. 321, n. 1, p. L6-L16, 2021. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00288.2020>.

MCNEAL, J. E. The zonal anatomy of the prostate. **Prostate**, v. 2, p. 35-49, 1981. <https://doi.org/10.1002/pros.2990020105>.

MEINHARDT, A.; BACHER, M.; MCFARLANE, J. R.; *et al.* Macrophage migration inhibitory factor production by Leydig cells: evidence for a role in the regulation of testicular function. **Endocrinology**, v. 137, n. 11, p. 5090-5095, 1996. <https://doi.org/10.1210/en.137.11.5090>.

MERK, M.; MITCHELL, R. A.; ENDRES, S.; BUCALA, R. D-dopachrome tautomerase (D-DT or MIF-2): doubling the MIF cytokine family. **Cytokine**, v. 59, n. 1, p. 10-17, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.03.014>.

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 DU-145 prostate cancer cells. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 12, p. 8730-8739, 2006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8730>.

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, p. 73, 2005. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-5-73>.

MEYER-SIEGLER, K.; FATTOR, R. A.; HUDSON, P. B. Expression of macrophage migration inhibitory factor in the human prostate. **Diagnóstico Molecular Patologia**, v. 7, n. 1, p. 44-50, 1998. <https://doi.org/10.1097/00019606-199802000-00008>.

MEYER-SIEGLER, K.; HUDSON, P. B. Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. **Urology**, v. 48, n. 3, p. 448-452, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(96\)00207-5](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(96)00207-5).

MEYER-SIEGLER, K.; VERA, P.; ICZKOWSKI, K. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene polymorphisms are associated with increased prostate cancer incidence. **Genes and Immunity**, v. 8, p. 646-652, 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364427>.

MONTANO, M.; BUSHMAN, W. Morphoregulatory pathways in prostate ductal development. **Developmental Dynamics**, v. 246, n. 2, p. 89-99, 2017. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24478>.

NINGYAN, G.; XU, Y.; HONGFEI, S.; JINGJING, C.; MIN, C. The role of macrophage migration inhibitory factor in mast cell-stimulated fibroblast proliferation and collagen production. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, e0122482, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122482>.

NISHIHARA, J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its essential role in the immune system and cell growth. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 20, n. 9, p. 751-762, 2000. <https://doi.org/10.1089/10799900050151012>.

NOE, J. T.; MITCHELL, R. A. MIF-Dependent Control of Tumor Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 609948, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.609948>.

OLIVEIRA, D. S. *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. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2016.917>.

OWEN, J. S.; CLAYTON, A.; PEARSON, H. B. Cancer-Associated Fibroblast Heterogeneity, Activation and Function: Implications for Prostate Cancer. **Biomolecules**, v. 13, n. 1, p. 67, 2022. <https://doi.org/10.3390/biom13010067>.

PAK, S.; PARK, S.; KIM, Y.; *et al.* The small molecule WNT/ β -catenin inhibitor CWP232291 blocks the growth of castration-resistant prostate cancer by activating the endoplasmic reticulum stress pathway. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 440, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1451-1>.

PAKULA, H.; XIANG, D.; LI, Z. A Tale of Two Signals: AR and WNT in Development and Tumorigenesis of Prostate and Mammary Gland. **Cancers (Basel)**, v. 9, n. 2, p. 14, 2017. <https://doi.org/10.3390/cancers9020014>.

PENG, L. *et al.* WNT5A inhibits human dental papilla cell proliferation and migration. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 390, n. 3, p. 1072-1078, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.136>.

PENTICUFF, J. C. *et al.* MIF family proteins in genitourinary cancer: tumorigenic roles and therapeutic potential. **Nat Rev Urol**, v. 16, n. 5, p. 318-328, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0171-9>.

PRINS, G. S.; PUTZ, O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*, v. 76, n. 6, p. 641-659, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2008.00277.x>.

RAMOS, R. F.; OSHIMA, C. T. F.; GOMES, T. S.; MADER, A. M. A. A.; ALVES, C. D. M.; WAISBERG, J. Immunohistochemical study of the canonical and non-canonical Wnt signaling pathway in colorectal carcinoma and non-neoplastic mucosa. **Journal of Coloproctology**, v. 35, n. 3, p. 156-161, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jcol.2015.06.002>.

RICHARDS, Z.; MCCRAY, T.; MARSILI, J.; *et al.* Prostate Stroma Increases the Viability and Maintains the Branching Phenotype of Human Prostate Organoids. **iScience**, v. 12, p. 304-317, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.01.028>.

RISBRIDGER, G. P.; ALMAHBOBI, G. A.; TAYLOR, R. A. Early prostate development and its association with late-life prostate disease. **Cell and Tissue Research**, v. 322, p. 173-181, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-1121-9>.

ROSKOSKI, R. Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. **Pharmacol Res**, v. 66, n. 2, p. 105-143, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>.

RUBINFELD, H.; SEGER, R. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. **Mol Biotechnol**, v. 31, n. 2, p. 151-174, 2005. <https://doi.org/10.1385/MB:31:2:151>.

SANCHES, B. D. A. et al. Stromal cell interplay in prostate development, physiology, and pathological conditions. **The Prostate**, v. 81, n. 13, p. 926-937, 2021. <https://doi.org/10.1002/pros.24196>.

SCHALKEN, J. Androgen Receptor Mediated Growth of Prostate (Cancer). **European Urology Supplements**, v. 4, n. 8, p. 4-11, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.eursup.2005.08.006>.

SERRE-BEINIER, V.; TOSO, C.; MOREL, P.; *et al.* Macrophage migration inhibitory factor deficiency leads to age-dependent impairment of glucose homeostasis in mice. **Journal of Endocrinology**, v. 206, n. 3, p. 297-306, 2010. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0342>.

SINGH, J.; ZHU, Q.; HANDELSMAN, D. J. Stereological evaluation of mouse prostate development. **Journal of Andrology**, v. 20, n. 2, p. 251-258, mar.-abr. 1999. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1999.tb02516.x>.

SUBBANNAYYA, T. *et al.* An integrated signal transduction network of macrophage migration inhibitory factor. **Journal of Cell Communication and Signal**, v. 10, n. 2, p. 165-170, jun. 2016. <https://doi.org/10.1007/s12079-016-0326-x>.

SUGIMURA, Y.; CUNHA, G. R.; DONJACOUR, A. A. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. **Biol Reprod**, v. 34, n. 5, p. 961-971, 1986. <https://doi.org/10.1095/biolreprod34.5.961>.

SUMAIYA, K. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF): A multifaceted cytokine regulated by genetic and physiological strategies. **Pharmacol Ther**, v. 233, p. 108024, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.108024>.

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. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 8, p. 946-955, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302009000800007>.

TAN, M. H.; LI, J.; XU, H. E.; MELCHER, K.; YONG, E. L. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 1, p. 3-23, 2015. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.18>.

THIELE, S.; GÖBEL, A.; RACHNER, T. D.; *et al.* WNT5A has anti-prostate cancer effects in vitro and reduces tumor growth in the skeleton in vivo. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 3, p. 471-480, 2015. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2362>.

THOMSON, A. A.; CUNHA, G. R.; MARKER, P. C. Prostate development and pathogenesis. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p. 559-564, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2008.00303.x>.

VERZE, P.; CAI, T.; LORENZETTI, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. **Nature Reviews Urology**, v. 13, n. 7, p. 379-386, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.89>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2019.10.003>.

VILAMAIOR, P. S.; TABOGA, S. R.; CARVALHO, H. F. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, v. 288, n. 8, p. 885-892, 2006. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20363>.

WEIBEL, E. R. Selection of the best method in stereology. **Journal of Microscopy**, v. 100, n. 3, p. 261-269, 1974. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1974.tb03938.x>.

WILSON, J. D.; GRIFFIN, J. E.; RUSSELL, D. W. Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. **Endocrine Reviews**, v. 14, n. 5, p. 577-593, 1993. <https://doi.org/10.1210/edrv-14-5-577>.

WIRTZ, T. H.; SAAL, A.; BERGMANN, I.; *et al.* Macrophage migration inhibitory factor exerts pro-proliferative and anti-apoptotic effects via CD74 in murine hepatocellular carcinoma. **British Journal of Pharmacology**, v. 178, n. 22, p. 4452-4467, 2021. <https://doi.org/10.1111/bph.15622>.

YANG, J. *et al.* WNT5A inhibits hepatocyte proliferation and concludes β -catenin signaling in liver regeneration. **Am J Pathol**, v. 185, n. 8, p. 2194-2205, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.04.021>.

ZHANG, B.; SHEN, M.; XU, M.; *et al.* Role of macrophage migration inhibitory factor in the proliferation of smooth muscle cell in pulmonary hypertension. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, p. 840737, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/840737>.

ZHANG, T. J.; HOFFMAN, B. G.; RUIZ DE ALGARA, T.; HELGASON, C. D. SAGE reveals expression of Wnt signalling pathway members during mouse prostate development. **Gene Expression Patterns**, v. 6, p. 310-324, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2005.07.005>.

ZHANG, Y. *et al.* Role of epithelial cell fibroblast growth factor receptor substrate 2alpha in prostate development, regeneration and tumorigenesis. **Development**, v. 135, n. 4, p. 775-784, 2008. <https://doi.org/10.1242/dev.009910>.