

GABRIEL HENRIQUE CAMPOLINA SILVA

**Mapeamento do receptor de vitamina D (VDR) no complexo prostático de
ratos Wistar durante o envelhecimento**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Fevereiro/2016

GABRIEL HENRIQUE CAMPOLINA SILVA

Mapeamento do receptor de vitamina D (VDR) no complexo prostático de ratos Wistar durante o envelhecimento

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dra. Cleida Aparecida de Oliveira

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Fevereiro/2016

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Biologia da Reprodução do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Cleida Aparecida de Oliveira, e contou com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

DEDICATÓRIA

Somos nós que fazemos a vida
Como der, ou puder, ou
quiser!

Gonzaguinha.

- Aos meus pais e familiares, em especial às minhas tias Arlete, Diva e Normélia, que sempre me fizeram acreditar nos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los. Essa conquista é mais do que minha, é de vocês!

- À minha querida orientadora, Professora Dr^a. Cleida Aparecida de Oliveira, por não medir esforços para que esse trabalho desse certo, pela agradável convivência e amizade, por todo apoio e dedicação, e pelos grandiosos ensinamentos que contribuem imensamente para minha formação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida e por não me conceder tudo o que peço, e sim, por reservar-me sempre o melhor!

Às minhas irmãs Camila e Juliana, pela confiança, cuidado e zelo, e aos meus pais, Regina e Geraldo, por todo sacrifício, apoio e pelo amor sincero e incondicional. Faltam-me palavras para expressar a gratidão que tenho por vocês, minha família!

À Cleida, minha querida orientadora e exemplo de profissional. Sou imensamente grato pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal que você me proporcionou, sempre disposta a fazer tudo o que estava ao seu alcance para execução desse trabalho. Sem dúvida, se concretizei mais esse sonho, foi porque você acreditou em mim!

Aos meus companheiros e amigos do LABRE, da velha e nova geração, os quais foram indispensáveis para o trilhar de mais esse caminho percorrido. Obrigado pelos conhecimentos compartilhados, amizade e por todo o convívio que tornaram meus dias mais agradáveis. Em especial, à Mônica e às minhas ICs favoritas, Bruna, Hipácia e Lelê, obrigado pela contribuição imensurável para a concretização desse trabalho e por sempre estarem dispostas a me ajudar, sem se importar com meu jeito esquecido e atrapalhado de ser ... não sei o que seria de mim sem vocês! Além disso, sou grato a vocês pelo incentivo em manter meus níveis de vitamina D normais no clube da UFMG, principalmente à Lelê, companheira inseparável. À Wiviane e Elisângela, agradeço a partilha do convívio, paciência e por sempre estarem disposta a me ajudar em todas as ocasiões, até mesmo nas várias vezes em que não sabia onde estava meu celular. Às amigas e ex-alunas do LABRE, Amandinha, Carina e Xúnia, por todas as risadas e pelo carinho para comigo. Sem dúvidas, vocês fazem muita falta em tornar o dia-a-dia do laboratório mais prazeroso. À Rê pela oportunidade de início no laboratório e pelos grandiosos ensinamentos. Ao André, Cristiano e aos alunos da Zoologia, por toda contribuição e por descontrair o ambiente de trabalho.

Ao professor Dr. Germán A. B. Mahecha, obrigado pela paciência e por compartilhar sua sabedoria.

À Daiane, que de “amor de carnaval” se tornou um amor para a vida inteira! Rsr. Obrigado pela cumplicidade, paciência, compreensão e companheirismo... ter você na minha vida é mais um presente de Deus!

À minha madrinha Diva, por todo amor e apoio, e às minhas tias Arlete e Normélia, pelo incentivo e por serem o exemplo de sabedoria que me fez chegar até aqui.

Aos meus amigos biólogos da PUC Betim, em especial, Karina, Camila, Michelle, Lucas, Eduardo, Jahn, Alison, Bárbara, Di, Luísa, Thaís, Martinha, Polly, Márcia, Lud, Natália, Jú, Murilo e Ramon, por partilharmos as incertezas, descobertas e desafios em busca do mesmo ideal.

Aos companheiros da FIOCRUZ, Raíssa, Rita, Lú e New, obrigado pelos ensinamentos, experiência, amizade e imensa ajuda que me fez chegar até aqui.

À toda família O.M e aos meus amigos Rafael, Bia e Alessandra, por todos os momentos compartilhados, conselhos, incentivos e pela cerveja dos finais de semana.

À tia Tânia e às minhas irmãzinhas Karen, Amanda e Ariane, pela companhia inseparável nos “Forrós” da vida e por serem uma família para mim.

Aos meus amigos da PPG-Biocel que foram grandes companheiros de jornada, em especial à Bruna, Jacque, Ana, Fabíola, Andréia, Alan, Bode, Guto e Evelyn.

Aos professores por terem contribuído com a minha formação e aos funcionários do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG.

A todos, meu mais sincero OBRIGADO!

RESUMO

A próstata é regulada por uma complexa combinação de sinais endócrinos e parácrinos, incluindo a Vitamina D, que age via seu receptor específico VDR, executando diversas funções como o controle da homeostase de cálcio e ações anti-inflamatórias e anti-carcinogênicas. Apesar da existência de muitos estudos sugerindo que a idade é um importante fator de risco para o desenvolvimento da hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata, duas patologias de grande relevância clínica, e que baixos níveis de Vitamina D, comumente encontrados no envelhecimento, podem contribuir para a ocorrência e progressão dessas patologias, pouco se sabe sobre a variação idade-dependente nas concentrações teciduais de VDR. Além disso, grande parte dos estudos relacionando a expressão desse receptor na próstata foi conduzida *in vitro*. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o padrão de expressão de VDR no complexo prostático de ratos Wistar adultos, durante o envelhecimento (3, 6, 12, 18 e 24 meses de idade), correlacionando estes resultados com os níveis de vitamina D e o desenvolvimento de alterações histopatológicas locais comuns na velhice. Os ensaios imunohistoquímicos revelaram que o VDR está amplamente distribuído em todo o complexo prostático de ratos, sendo observada intensa positividade para esse receptor no núcleo das células do epitélio e do estroma glandular. Maior intensidade de imunomarcção para VDR foi detectada no núcleo das células basais do epitélio prostático em comparação às células luminiais. Um aumento significativo nos níveis proteicos de VDR foi detectado a partir dos 12 meses de idade, o qual ocorreu paralelo a marcante redução de cerca de 2,8 vezes nas concentrações plasmáticas de 25(OH)D. A intensidade de marcação para VDR nas células positivas em áreas de atrofia epitelial, hiperplasia ou neoplasia intraepitelial prostática (PIN), as quais são consideradas áreas de alterações epiteliais mais prevalentes em animais senis (18 e 24 meses), foi similar à observada para as células do epitélio normal adjacente. Entretanto, vale ressaltar que a proporção de células não-reativas para tal receptor foi significativamente maior nas áreas de PIN em comparação ao epitélio normal adjacente. Esses relevantes resultados em conjunto com os dados na literatura sustentam: a) a existência de variação idade-dependente no sistema endócrino vitamina D; b) a hipótese de que a vitamina D é um importante hormônio atuante na próstata, inclusive no tecido prostático normal; c) a necessidade de se considerar os níveis proteicos de VDR nas células-alvo para interpretar a magnitude da sinalização da vitamina D, os quais podem ser inversamente

proporcionais aos níveis circulantes de 25(OH)D; d) um possível envolvimento entre o desbalanço local na via do receptor VDR e a carcinogênese prostática, visto que o maior número de células VDR negativas foram observadas em áreas de PIN, as quais são consideradas lesões pré-malignas.

ABSTRACT

The prostate is regulated by a complex interplay of endocrine and paracrine signals, including Vitamin D that acts via its specific VDR receptor, carrying out diverse functions such as calcium homeostasis, anti-inflammatory and anti-carcinogenic actions. Despite several studies suggesting that age is an important risk factor for development of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer, both conditions of great clinical relevance, and that low levels of vitamin D commonly found in aging might contribute to the occurrence and progression of these diseases, little is known about the age-dependent variation in tissue concentrations of VDR. In addition, most of the studies concerning VDR expression in the prostate was conducted *in vitro*. Therefore, our aim was to evaluate the expression pattern of VDR in the prostatic complex of adult Wistar rats, during aging (3, 6, 12, 18 and 24 months of age), correlating these results with the vitamin D levels and the development of punctual histopathological changes common in advancing age. The immunohistochemical assays revealed that VDR is widely distributed throughout the prostatic complex of Wistar rats, as an intense positivity was observed for this receptor in nuclei of both epithelial and stromal cells. Higher intensity of VDR immunoreactivity was detected in nuclei of basal cells in the glandular epithelium compared to the luminal cells. Significant increase in VDR levels was detected after 12 months of age, paralleling a marked reduction of about 2.8-fold in the plasma concentration of 25(OH)D. The immunostaining intensity for VDR-positive cells in areas of epithelial atrophy, hyperplasia or prostate intraepithelial neoplasia (PIN), which are considered morphological alterations commonly found in the prostatic epithelium of senile rats (18 and 24 months), was similar to that observed for the adjacent normal epithelium. However, it is noteworthy that the proportion of cells VDR-negative was significantly higher in PIN areas compared to normal epithelium. Taken together with the literature, these relevant results support: a) the existence of age-dependent variation in the vitamin D endocrine system; b) the hypothesis that vitamin D is a putative hormone acting in prostate, including the normal gland; c) the need to consider the amount of VDR protein to interpret the magnitude of vitamin D signaling in target cells, which might be inversely related to circulating levels of 25(OH)D; d) a possible involvement of a punctual disorder in the VDR pathway and the prostate carcinogenesis, since the higher number of VDR-negative cells was observed in PIN areas, which are considered premalignant lesions in the prostate.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Estrutura anatômica da próstata humana evidenciando as zonas glandulares e a zona anterior dispostas concentricamente em torno da uretra.	19
Figura 2: Representação anatômica da organização do complexo prostático de roedores em pares de lobos em torno da uretra.	20
Figura 3: Histologia da próstata humana (A) e de ratos (B) após coloração com o ácido periódico-Schiff.	23
Figura 4: Estrutura química das vitaminas D ₂ (ergocalciferol) e D ₃ (colecalciferol).	26
Figura 5: Fontes e metabolismo da vitamina D, evidenciando as principais enzimas e órgãos envolvidos.	29
Figura 6: Estrutura molecular do receptor de vitamina D e do complexo VDR/RXR.	31
Figura 7: Atividade da 1 α ,25(OH) ₂ D nas células prostáticas via seu receptor VDR.	35
Figura 8: Fluxograma do processamento de imagem para mensuração da intensidade média de pixel referente à imunomarcação do VDR.	44
Figura 9: Peso corporal de ratos Wistar de 3 a 24 meses de idade (M).	48
Figura 10: Gráficos de dispersão representativos da correlação entre o peso corporal e o peso absoluto dos lobos ventral (VP), dorsal (DP), lateral (LP) e anterior (AP) dos animais experimentais.	49
Figura 11: Imunomarcação para VDR nas próstatas ventral (A – E), dorsal (G – K), lateral (M – Q) e anterior (S – W) de ratos em diferentes idades.	52
Figura 12: Análise quantitativa da intensidade de expressão do VDR no epitélio das próstatas ventral (VP) e dorsal (D) de ratos Wistar ao longo do envelhecimento.	53

	Página
Figura 13: Expressão de VDR nas próstatas ventral (A), dorsal (B), lateral (C) e anterior (D) destacando a imunomarcacão entre as células basais (cabeças de setas) e as células luminais (setas).	54
Figura 14: Quantificacão da proporção de células negativas para VDR no epitélio da próstata de ratos em relação à idade dos animais (A), aos lobos prostáticos e entre áreas de epitélio normal e PIN (C).	55
Figura 15: Expressão de VDR nas próstatas ventral (A), dorsal (B), lateral (C) e anterior (D), destacando a imunomarcacão nas células da PIN.	56
Figura 16: Expressão de VDR nas próstatas ventral (A), dorsal (B), lateral (C) e anterior (D) de ratos de 18 a 24 meses de idade, comparando a imunomarcacão em áreas de pregueamento epitelial sugestivo de hiperplasia (H) em relação ao epitélio normal adjacente (En).	57
Figura 17: Expressão de VDR na próstata ventral de ratos comparando a intensidade de imunomarcacão entre o epitélio atrófico (Ea) e o epitélio normal adjacente (En).	58
Figura 18: <i>Western blotting</i> mostrando os níveis intraprostáticos de VDR nos lobos ventral (A), dorsal (B), lateral (C) e anterior (D) de ratos de 3 aos 24 meses de idade (3M–24M), seguido da representação gráfica da análise densitométrica das bandas obtidas (55 e 50 kDa).	59
Figura 19: Níveis de 25(OH)D total no plasma de ratos Wistar em diferentes idades.	60

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Peso relativo dos lobos prostáticos de ratos Wistar em diferentes idades.	49

LISTA DE ABREVIATURAS
(Apresentadas em ordem alfabética)

1α,25(OH)₂D –	1 α ,25-diidroxivitamina D
25(OH)D –	25-hidroxivitamina D
7-DHC –	7-dihidrocolesterol
ANOVA –	Análise de variância
AP –	Próstata anterior
Ca²⁺ –	Cálcio
CYP –	Citocromo P450
DBD –	Domínio de ligação ao DNA
DBP –	<i>Vitamin D binding protein</i>
DHT –	Diidrotestosterona
DNA –	Ácido desoxirribonucleico
DP –	Próstata dorsal
HPB –	Hiperplasia prostática benigna
INCA –	Instituto Nacional do Câncer
kDa –	Quilodaltons
LBD –	Domínio de ligação ao ligante
LP –	Próstata lateral
M –	Meses de idade
NBF –	Formalina neutra tamponada

PBS –	Tampão fosfato
PIN –	Neoplasia intraepitelial prostática
PSA –	Antígeno prostático específico
PTH –	Paratormônio
RNA_m –	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-qPCR –	Reação da transcriptase reversa, seguida da reação quantitativa em cadeia da polimerase
RXR –	Receptor retinoide X
SDS –	Dodecil sulfato de sódio
SEM –	Erro padrão da média
UVB –	Raios solares ultravioleta B
VDR –	Receptor de vitamina D
VDRE –	Elementos responsivos à vitamina D
VP –	Próstata ventral

SUMÁRIO

	Página
I. REVISÃO DE LITERATURA	17
1. A próstata	17
1.1 Características gerais	17
1.2 Estrutura da próstata	18
1.2.1 Próstata humana	18
1.2.2 Próstata de ratos	19
1.3 Histologia da próstata	22
2 Vitamina D	25
2.1 Fontes e metabolismo da vitamina D	26
2.2 O receptor de vitamina D (VDR)	29
2.3 Funções da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ no organismo	32
3 Relação entre vitamina D, próstata e envelhecimento	33
II. OBJETIVOS	38
1. Objetivo geral	38
2. Objetivos específicos	38
III. METODOLOGIA	40
1. Animais experimentais	40
2. Coleta e preparação dos tecidos	40
3. Imunohistoquímica	41
4. Extração de proteínas totais	41
5. <i>Western blotting</i>	42
6. Intensidade de imunomarcção para VDR	43

SUMÁRIO

7. ELISA	45
8. Análise estatística	46
IV. RESULTADOS	48
1. Peso corporal e do complexo prostático	48
2. Padrão de expressão do VDR no complexo prostático	50
3. <i>Western blotting</i>	58
4. ELISA	60
V. DISCUSSÃO	62
VI. CONCLUSÃO	76
VII. PERSPECTIVAS	78
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

I. REVISÃO DE LITERATURA

I. REVISÃO DE LITERATURA

1. A PRÓSTATA

1.1 Características gerais

A próstata é a maior glândula sexual anexa do sistema genital masculino e está presente em todas as ordens de mamíferos, sendo responsável pela síntese do líquido prostático, composto essencial para o processo de fertilização (Kumar & Majumder, 1995). Além da importância fisiológica, a próstata é acometida por doenças que tem se tornado um problema crescente na área médica, sejam elas de caráter benigno, como as prostatites e a hiperplasia prostática benigna (HPB), ou maligno, como o adenocarcinoma. Tais doenças apresentam grande relevância clínica em função da elevada incidência com que ocorrem e por comprometerem a qualidade e/ou a perspectiva de vida dos portadores. Dessa forma, a próstata tem sido um dos órgãos genitais mais estudados, mas mesmo assim, muitos assuntos pertinentes ainda permanecem não esclarecidos.

A principal função da próstata é produzir e secretar o líquido prostático, uma secreção homogênea, serosa e levemente ácida (pH 6,6), produzida pelas células epiteliais prostáticas e que corresponde aproximadamente 30% do líquido seminal. Essa secreção possui composição diversificada, onde se encontram lípidos, como o colesterol e a cefalina, zinco, citrato de cálcio, magnésio, sódio e ácido cítrico, além de uma variedade de enzimas, albumina e outras substâncias (Aumüller, 1989; Kumar & Majumder, 1995). Cada um dos componentes do líquido prostático contribui para prover as condições necessárias à sobrevivência dos espermatozoides, tanto durante sua veiculação pelas vias espermáticas do sistema genital masculino, quanto no trato genital feminino, sendo, portanto, essenciais para o sucesso reprodutivo (Kumar & Majumder, 1995). Por exemplo, os altos níveis de zinco presentes no líquido prostático são importantes para a proteção dos gametas masculinos, em função da ação antioxidante e antibactericida desempenhada por este mineral. Adicionalmente, o citrato de cálcio atua como um alcalinizador do pH vaginal, ação fundamental para garantir a sobrevivência dos espermatozoides nas vias genitais femininas. Além disso, enzimas como a fibrinolizina, coagulase e o antígeno prostático específico (PSA), todas secretadas pelo epitélio glandular da próstata, estão envolvidas com a liquefação do sêmen e do muco

cervical, facilitando assim, a veiculação dos gametas masculinos. Já a fosfatase ácida realiza a conversão enzimática da fosforilcolina em colina, a qual juntamente com o colesterol e outros lípidos, promove a nutrição dos espermatozoides (Aumüller, 1979; Kumar & Majumder, 1995).

1.2 Estrutura da próstata

A próstata está localizada no interior da cavidade pélvica, logo abaixo do colo da bexiga, circundando a porção inicial da uretra, denominada uretra prostática. É um órgão encapsulado por uma fina camada de tecido conjuntivo e seu parênquima é formado por numerosas glândulas túbulo-alveolares de atividade principalmente exócrina, dispostas de maneira concêntrica ao redor da uretra prostática, como ocorre em humanos (McNeal, 1988), ou na forma de lobos, como observado em roedores (Hayashi et al. 1991; Risbridger & Taylor, 2006).

1.2.1 Próstata humana

A próstata humana é um órgão ímpar que pode ser dividido em três regiões glandulares, denominadas zona central, zona de transição e zona periférica, e uma região aglandular constituída apenas por tecido fibromuscular, a zona anterior (McNeal, 1981; Laczko et al. 2005), as quais estão exemplificadas na figura 1. Dispostas concentricamente ao redor da uretra, essas zonas glandulares se distinguem uma das outras pela sua localização, volume e significância patológica, como brevemente descrito a seguir.

A zona central corresponde cerca de 20–25% do volume da glândula e se encontra ao redor dos ductos ejaculatórios, sendo raramente acometida por patologias prostáticas (McNeal, 1981; Shappel et al. 2004). A zona de transição abrange menos de 10% do volume da glândula e constitui-se de tecido glandular disposto em torno da porção proximal da uretra prostática. É nesta região que ocorre a maior incidência de HPB, com conseqüente formação de massas nodulares de células epiteliais que podem comprimir a uretra prostática, dificultando assim, a micção (McNeal, 1988; Shappel et al. 2004; Risbridger & Taylor, 2006). Já a zona periférica é a maior das subdivisões anatômicas da próstata humana e

envolve a porção distal da uretra e as zonas central e de transição. Correspondendo a cerca de 70% da massa prostática, a zona periférica é o local mais suscetível à inflamação e ao desenvolvimento de carcinomas prostáticos (McNeal, 1981; Shappell et al. 2004; Risbridger & Taylor, 2006), sendo essa a região palpável durante o exame digital do reto e também utilizada na obtenção de amostras para biópsias. Vale ressaltar que os cânceres de próstata podem ter origem também na zona de transição, porém estes são menos graves e incidem com menor frequência nessa região, quando comparado com os tumores que acometem a zona periférica (Shappell et al. 2004). O volume das zonas glandulares da próstata humana sofre alteração com o avançar da idade, devido ao acometimento da glândula por desordens proliferativas comuns na velhice.

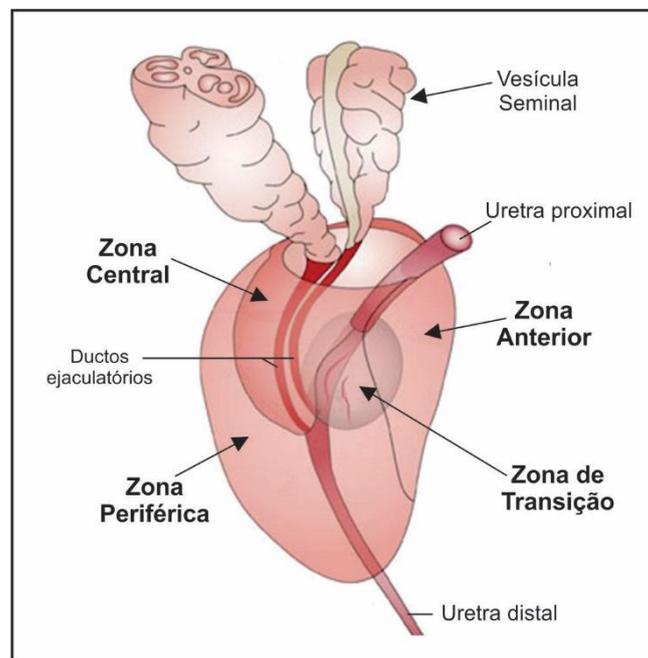


Figura 1 | Estrutura anatômica da próstata humana evidenciando as zonas glandulares e a zona anterior, dispostas concentricamente em torno da uretra. Adaptado de Wadhera, 2013.

1.2.2 Próstata de ratos

Hayashi et al. (1991) realizaram um estudo minucioso no qual descreveram através da técnica de microdissecção, toda a organização morfológica bem como a morfogênese e o

desenvolvimento do complexo prostático de ratos, desde o primeiro dia após o nascimento até os animais atingirem a fase adulta. Com base neste estudo pioneiro e em investigações posteriores, a próstata de ratos foi subdividida anatomicamente em quatro pares de lobos, classificados de acordo com a disposição dos mesmos em relação à uretra, denominados como próstatas ventral, dorsal, lateral e anterior, sendo este último também conhecido como glândula de coagulação (Figura 2) (Hayashi et al. 1991; Hayward et al. 1996a; Risbridger & Taylor, 2006). Essa organização da próstata em lobos parece ser compartilhada entre os roedores, como observado também em camundongos (Sugimura et al. 1986) e em gerbilineos, como o esquilo-da-mangólia (Gonçalves et al. 2013). Devido a essas subdivisões, a próstata desses animais é também referida como “complexo prostático”. Cada lobo está envolvido por uma fina capsula de tecido conjuntivo que os separam em compartimentos próprios e atribui forma específica aos mesmos. Adicionalmente, esta capsula conjuntiva conecta os ductos prostáticos de um mesmo lobo, os quais desembocam na uretra prostática, onde a secreção da glândula é lançada (Hayashi et al. 1991). Uma descrição mais detalhada dos diferentes lobos que compõem o complexo prostático de ratos na fase adulta, o modelo animal adotado no presente trabalho, é realizada a seguir conforme os principais achados de Hayashi et al. (1991).

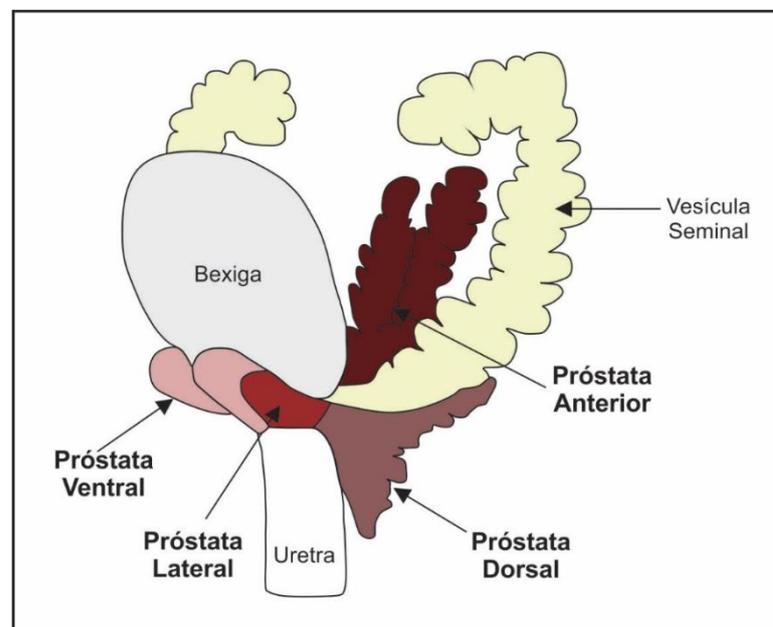


Figura 2 | Representação anatômica da organização do complexo prostático de roedores em pares de lobos em torno da uretra. Adaptado de Sugimura et al. 1986.

A próstata ventral (VP) é o principal lobo utilizado em estudos científicos e compreende cerca da metade da massa de todo o complexo prostático (44%), consistindo em um par de lobos localizados logo abaixo da bexiga (Figura 2). Cada lobo é composto por 2–3 ductos principais que se ramificam individualmente em 8–12 ductos secundários, os quais convergem para numerosos ductos terminais ou adenômeros, situados na porção mais distal do lobo. Os adenômeros da VP apresentam epitélio pseudoestratificado prismático e é pouco pregueado (Hayashi et al. 1991).

A próstata dorsal (DP) compreende cerca de 14% da massa do complexo prostático e se dispõe posterior à próstata lateral, caudalmente à bexiga e inferoposterior à vesícula seminal (Figura 2). Cada lobo consiste em 5–6 ductos principais que desembocam na porção dorsal da uretra, os quais também formam uma complexa ramificação que culminam em adenômeros com poucas pregas epiteliais (Hayashi et al. 1991).

Já a próstata lateral (LP) consiste em dois lobos localizados logo abaixo da vesícula seminal e da próstata anterior, ladeando a VP e apoiando-se caudalmente à DP (Figura 2). Seu volume é igual ao observado para a DP, compreendendo cerca de 14% da massa do complexo prostático. Aparentemente, a próstata lateral é formada por dois tipos de ductos principais (longos e curtos) que permitem ainda a subdivisão de cada lobo em LP tipo I e LP tipo II. Apesar disso, estes ductos principais emergem da mesma região da uretra prostática e culminam na porção distal, em adenômeros com epitélio colunar mais baixo e com maior pregueamento, quando comparado com a VP e DP (Hayashi et al. 1991).

Por fim, a próstata anterior (AP) ou glândula de coagulação, compreende cerca de 25% da massa de todo o complexo prostático e está localizada adjacente à vesícula seminal, mais exatamente em sua face côncava (Figura 2). Cada lobo é composto por um longo ducto principal que desemboca na porção crânio-posterior da uretra, o qual origina 40–50 ductos terminais com estrutura tubular. Este lobo prostático apresenta epitélio simples colunar de altura variada, sendo que a atividade secretora parece ser heterogênea ao longo da glândula, uma vez que se observam regiões pouco pregueadas e contendo muita secreção no lume, e outras com pregueamento epitelial mais intenso e apresentando pouca secreção acumulada (Hayashi et al. 1991).

Apesar da diferença anatômica, roedores são usados como modelo de estudo para fisiopatologia da próstata, e sua comparação com a próstata humana é devido ao fato de

ambas apresentarem semelhanças no desenvolvimento fetal, originando-se a partir da porção pélvica do seio urogenital, e de que ratos idosos desenvolvem quadros patológicos espontâneos na próstata similares aos de humanos, incluindo alterações pré-malignas e malignas (Pollard, 1973; Hayward & Cunha, 2000; Morais-Santos, 2015). Interessantemente, com exceção da próstata ventral, os lobos prostáticos de ratos possuem correspondências histopatológicas com a próstata humana, sendo a AP correspondente à zona central, e ambas DP e LP correspondentes à zona periférica da próstata de humano (Pollard, 1973; Danielpour et al. 1994). Tal fato justifica a utilização de roedores como modelo experimental e atribui importância para o estudo sistemático diferenciando os lobos prostáticos.

1.3 Histologia da próstata

A próstata de humanos e de outros modelos animais incluindo o rato, possuem estrutura histológica muito similar (Hayward & Cunha, 2000; Risbridger & Taylor, 2006). Classificada como uma glândula túbulo-alveolar composta, a próstata possui vários ductos que dão origem às unidades secretoras de formato tubular ou alveolar, as quais são revestidas por epitélio glandular, geralmente prismático, e composto por três tipos celulares morfofuncionalmente distintos e descritos a seguir conforme a frequência com que ocorrem no epitélio, sendo eles: as células secretoras ou luminais, as células basais e as células neuroendócrinas (Figura 3).

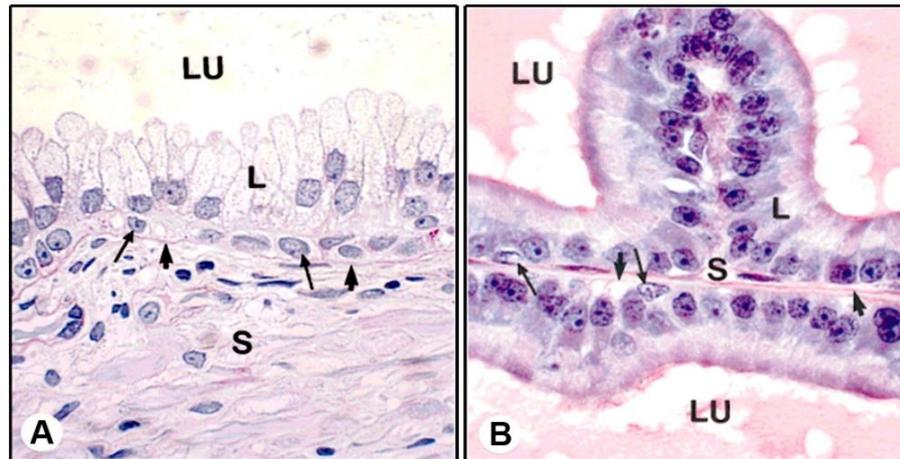


Figura 3 | Histologia da próstata humana (A) e de ratos (B) após coloração com o ácido periódico-Schiff. Células secretoras ou luminais (L); células basais (setas compridas); membrana basal (setas curtas); lume (LU); estroma (S). Aumento (700x). Adaptado de El-Alfy et al. 2000.

As células secretoras, também conhecidas como luminais, são células altas do tipo prismático ou colunar e são responsáveis pela produção dos principais componentes do líquido prostático. Devido a sua função secretora, essas células são altamente diferenciadas e caracterizadas por possuírem um aparelho de Golgi muito desenvolvido, retículo endoplasmático granular abundante e numerosos grânulos de secreção apicais. Por expressarem receptores específicos, essas células são responsivas tanto a andrógenos quanto a estrógenos. Alguns dos componentes sintetizados por elas, como o PSA e a fosfatase ácida prostática, podem ser utilizados como marcadores de diferenciação das mesmas, em humanos (Hayward et al. 1996a; El-Alfy et al. 2000; Risbridger & Taylor, 2006).

As células basais foram bem caracterizadas pelo trabalho pioneiro de El-Alfy e et al. (2000), no qual avaliou-se os aspectos histológicos da próstata humana e de primatas não-humanos (macacos), bem como da próstata de roedores (rato e camundongo) e de cachorro, focando também na caracterização morfofuncional das células basais. Esse tipo celular possui pouco citoplasma e um núcleo pequeno, o qual possui forma irregular e apresenta cromatina bem condensada. As células basais são reconhecidas por se localizarem na porção basal do epitélio, se apoiando à membrana basal, sem atingir a superfície luminal (El-Alfy et al. 2000; Taylor & Risbridger, 2008). Mais recentemente, Shum et al. (2008) elegantemente

demonstraram, pela primeira vez, que muitas células basais são capazes de emitir longas e delgadas projeções que alcançam o lume prostático. Essas projeções são observadas também nas células basais do epitélio de outros órgãos do sistema genital masculino e do trato respiratório (Shum et al. 2008).

Dentro da população de células basais no epitélio prostático, algumas apresentam-se mais indiferenciadas e podem funcionar como progenitoras das células secretoras, mantendo uma característica de célula-tronco (El-Alfy et al. 2000). Outras apresentam fenótipo mais diferenciado, no qual observa-se a expressão de enzimas esteroidogênicas, indicando uma possível participação na função regulatória do epitélio (El-Alfy et al. 2000; Risbridger & Taylor, 2006). Em humanos, as células basais da próstata podem também apresentar junções oclusivas entre elas, de modo a formar uma barreira epitelial, ou ainda apresentar junções comunicantes entre elas assim como entre as células secretoras, característica que indica um importante papel na comunicação célula-célula (El-Alfy et al. 2000).

A proporção média de células basais em relação às células secretoras varia de acordo com a espécie (humanos – 1:1, camundongo – 1:4; cachorro e macaco – 1:7; rato – 1:10) (El-Alfy et al. 2000), e por essa razão, diferenças quanto à distribuição das células basais no epitélio prostático são observadas entre humanos e os demais modelos experimentais. Por exemplo, em roedores, macacos e cachorros, esse tipo celular é menos numeroso que no humano e está distribuído uniformemente entre as células secretoras do epitélio, sempre apoiada à membrana basal. Já em humanos, as células basais são tão numerosas quanto as células secretoras e encontram-se distribuídas ao longo de todo o epitélio prostático, logo abaixo das células secretoras, formando uma camada mais contínua de células que repousam sobre a membrana basal (El-Alfy et al. 2000).

As células neuroendócrinas compõem o terceiro tipo celular do epitélio prostático e recebem essa denominação por apresentarem características regulatórias, tanto de células neurais quanto de células endócrinas. O número de células neuroendócrinas varia consideravelmente ao longo da idade, sendo mais expressivo durante o período inicial de desenvolvimento da glândula. Já no adulto, estas células são esporádicas e ocorrem dispostas isoladamente ou em pequenos grupos no epitélio glandular (Abrahamsson, 1999; Rodríguez et al. 2003). As células neuroendócrinas não expressam PSA e nem receptores de andrógenos, mas estão envolvidas na secreção do neuropeptídeo Y, serotonina, cromograninas A e B, além

de calcitonina, somatostatina, dentre outros, e acredita-se que estas células participem da regulação do crescimento e da atividade secretora da glândula, de maneira parácrina e autócrina (Abrahamsson, 1999; Rodríguez et al. 2003; Risbridger & Taylor, 2006).

Circundando o parênquima glandular encontra-se o estroma prostático, o qual é composto por tecido conjuntivo, contendo vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e células de defesa, além de fibras musculares lisas (Hayward et al. 1996b). A musculatura lisa na próstata humana é abundante e encontra-se amplamente distribuída por todo o estroma, divergindo do observado em roedores, onde as fibras musculares lisas são menos abundantes e formam uma delgada camada de três a cinco células de espessura que circundam o adenômero glandular (Aumüller, 1979; Hayward et al. 1996b). Tanto em humanos quanto nos demais modelos experimentais, essa musculatura lisa sofre contração durante a ejaculação e auxilia a ejeção do líquido prostático no lume da uretra.

2. VITAMINA D

Sabe-se que os andrógenos desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento e na manutenção da morfofisiologia da próstata, sendo a diidrotestosterona (DHT, metabólito da testosterona) o principal andrógeno local (Risbridger & Taylor, 2006). No entanto, o mecanismo de regulação da próstata é complexo e envolve também a participação de outros esteroides e seus receptores nucleares, tais como estrógenos (produto da aromatização de testosterona) e a vitamina D, os quais também podem estar envolvidos em desordens patológicas da glândula (Prins & Korach, 2008; Swami et al. 2011). O papel dos estrógenos na próstata já está melhor estabelecido, mas pouco se sabe sobre vitamina D e seu receptor na próstata, sendo este o alvo de investigação proposto neste trabalho.

Vitamina D é um termo designado para referir-se ao ergocalciferol (vitamina D₂, origem vegetal) e colecalciferol (vitamina D₃, origem animal), os quais são considerados pró-hormônios lipossolúveis essenciais para a saúde humana. Ambas vitaminas D₂ e D₃ (Figura 4) são produzidas a partir de um processo fotolítico que ocorre por influência dos raios solares ultravioleta B (UVB), e posteriormente, são metabolizadas em compostos que desempenham papel protetor contra várias doenças (Holick, 2004; Holick & Chen, 2008). Atualmente, o

termo vitamina D abrange também alguns de seus metabólitos como o 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] e o 1 α ,25-diidroxivitamina D [1 α ,25(OH) $_2$ D] ou calcitriol. No presente trabalho, adotou-se a denominação original para vitamina D (vitaminas D $_2$ e D $_3$), considerando seus metabólitos separadamente para um melhor entendimento. Além disso, foi dada uma atenção maior à vitamina D $_3$, uma vez que esta é a principal forma encontrada naturalmente na maioria dos vertebrados, incluindo o homem.

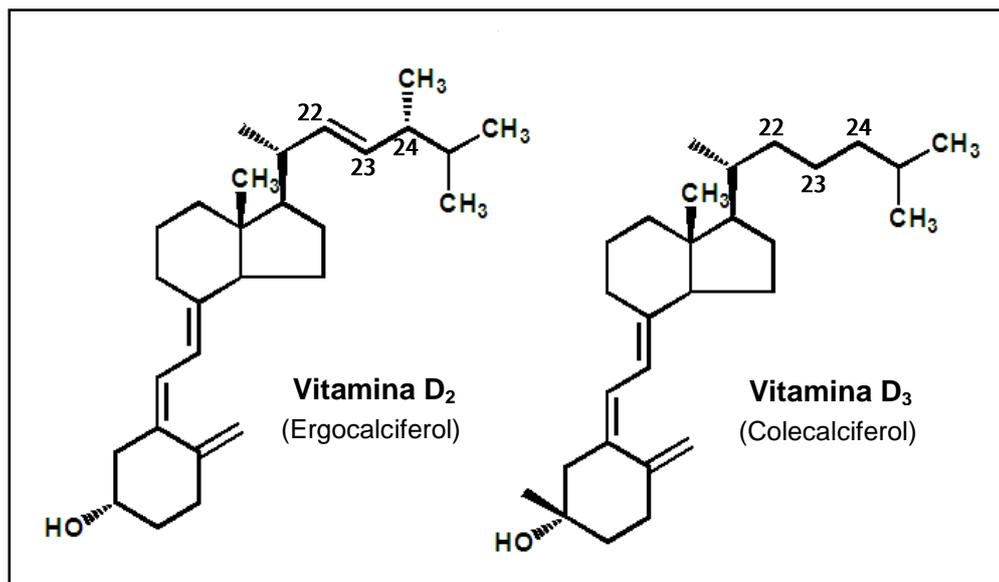


Figura 4 | Estrutura química das vitaminas D $_2$ (ergocalciferol) e D $_3$ (colecalciferol). Note que a vitamina D $_2$ difere da D $_3$ por apresentar uma ligação dupla entre os carbonos 22 e 23, além de um grupo metil no carbono 24.

2.1 Fontes e metabolismo da vitamina D

Em humanos, cerca de 10% a 20% da vitamina D necessária para manter a adequada função do organismo é provida pela dieta. Grande parte dos alimentos possui naturalmente pouca ou nenhuma vitamina D, exceto alguns peixes como sardinha e salmão, ricos em vitamina D $_3$, e também alguns fungos comestíveis que contêm grande quantidade de vitamina D $_2$. Portanto, a maior parte da vitamina D é resultante da síntese endógena após exposição à luz solar e ocorre na forma de vitamina D $_3$ (Holick et al. 2004).

Estudos pioneiros realizados por Holick e colaboradores, utilizando ratos expostos à irradiação ultravioleta (Holick et al. 1977; 1979) e posteriormente pele humana (Holick et al. 1980; 1981), demonstraram que a irradiação UVB (máxima eficiência em 290 – 320 nm) promove a conversão fotossintética do 7-dihidrocolesterol (7-DHC) em pré-vitamina D₃, a qual é posteriormente isomerizada em D₃ por um processo termo sensível. A principal produção de vitamina D₃ ocorre na epiderme, a camada da pele que possui a maior quantidade do precursor 7-DHC e o principal local de absorção da irradiação ultravioleta (Holick et al. 1980).

A síntese endógena de colecalciferol é diretamente influenciada pelo tempo de exposição à luz solar, sendo este um processo finamente regulado pelo corpo de modo a evitar uma toxicidade em casos de exposição prolongada (Webb et al. 1989). Além disso, a produção de vitamina D₃ pode ser afetada por outros fatores como o grau de pigmentação da pele, uso de protetor solar e alguns tipos de roupas, faixa etária e o ângulo de incidência dos raios solares na terra (ângulo zenital), o qual é dependente da latitude, estação do ano e hora do dia (Holick et al. 1980; MacLaughlin & Holick, 1985; Webb et al. 1989). Esses fatores em associação com a baixa exposição à luz solar podem levar a uma deficiência de vitamina D, condição clínica recentemente considerada uma pandemia com prevalência nas mais variadas idades, raças, situações econômicas e regiões geográficas, e que tem sido associada com o aumento do risco de doenças esqueléticas e não esqueléticas, incluindo cânceres (Holick, 2008).

A vitamina D é biologicamente inativa, e para exercer suas diversas funções nos diferentes sistemas fisiológicos, dois processos enzimáticos que adicionam grupos hidroxilas a estrutura da molécula são necessários, resultando assim, em seu metabólito ativo, o 1 α ,25(OH)₂D. Destes processos participam enzimas pertencentes à superfamília do citocromo P450 (CYP), um grupo de proteínas que desempenham papéis importantes na metabolização não só de vitaminas, mas também de outros compostos vitais como hormônios esteroides e ácidos biliares, além do metabolismo de drogas (Gonzalez, 1990).

No primeiro momento, a vitamina D proveniente da síntese cutânea ou da dieta atinge a circulação sanguínea e quando chega ao fígado, sofre uma hidroxilação no carbono 25 dando origem ao 25(OH)D. A principal enzima com atividade 25-hidroxilase é a CYP2R1, cuja expressão ocorre principalmente no fígado. Contudo, sabe-se que outras CYPs também

podem desempenhar tal atividade e conseqüentemente contribuir com a conversão da vitamina D em 25(OH)D (Zhu et al. 2013). Este primeiro metabólito é considerado a principal forma circulante da vitamina D e sua concentração no sangue tem sido empregada na avaliação do status de vitamina D. Em seguida, a 25(OH)D é convertida para sua forma hormonal, a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, pela ação 1α -hidroxilase da enzima CYP27B1. É nos túbulos proximais dos rins que ocorre a principal síntese de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, e este processo é regulado por três hormônios principais: paratormônio (PTH), fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF-23) e o próprio $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$. Neste sentido, o PTH estimula a expressão e atividade da CYP27B1, enquanto que os outros dois desempenham efeitos inibitórios (Gao et al. 2002; Kim et al. 2007; Bikle, 2014). Vale ressaltar que a expressão da CYP27B1 tem sido identificada em células de uma variedade de tecidos, como a pele, cérebro, placenta, pulmão, intestino, glândulas endócrinas, incluindo adrenal e tireoide, além das ilhotas pancreáticas, testículo, glândulas mamárias e próstata, fato este que possibilita a produção extra-renal de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Jones et al. 1999; Hsu et al. 2001; Zehnder et al. 2001; Segersten et al. 2002; 2005; Bikle, 2009). Entretanto, a regulação da atividade da CYP27B1 nestes tecidos é diferente do observado nos rins, sendo regulada principalmente por citocinas e fatores locais específicos de cada célula (Bikle, 2009).

O metabólito ativo da vitamina D, o $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ ou calcitriol, medeia seus efeitos hormonais nos tecidos alvos através da ligação ao seu receptor específico (descrito a seguir), ou então pode ser reduzido a compostos menos ativos pela atividade 23,24-hidroxilase da CYP24A1, uma enzima importante para o controle dos níveis teciduais de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ e cuja expressão é regulada pelo PTH e pela própria $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Jones et al. 1999; Zierold et al. 2003; Bikle, 2014). Vale ressaltar que tanto a vitamina D quanto seus metabólitos são transportados no sangue acoplados à glicoproteína DBP (do inglês *vitamin D binding protein*). O processo de produção, assim como as etapas do metabolismo da vitamina D estão exemplificados na figura 5.

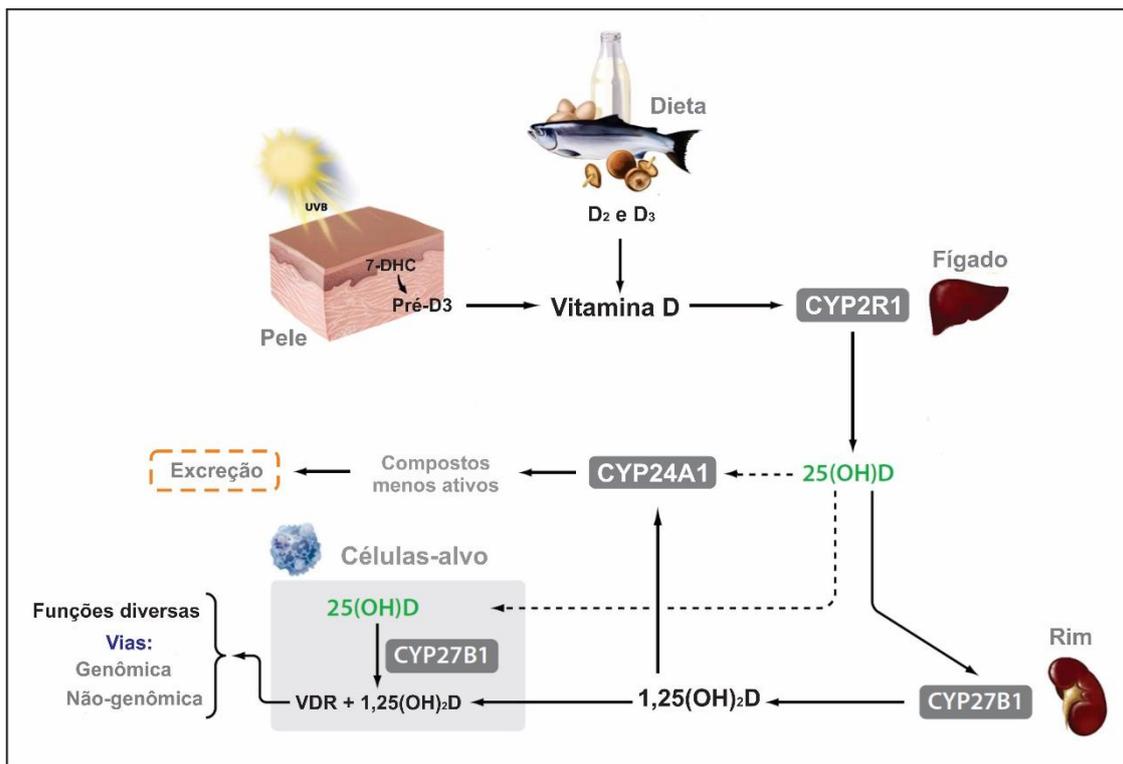


Figura 5 | Fontes e metabolismo da vitamina D, evidenciando as principais enzimas e órgãos envolvidos. Adaptado de Krishnan & Feldman, 2011.

2.2 O receptor de vitamina D (VDR)

Os efeitos biológicos da vitamina D em sua forma ativa, a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, são mediados pela ligação ao receptor de vitamina D (VDR, *vitamin D receptor*), um fator de transcrição pertencente à superfamília dos receptores nucleares, a qual inclui também os receptores de andrógenos, estrógenos, glicocorticoides, mineralocorticoides, hormônios da tireoide e do ácido retinoico (Mangelsdorf et al. 1995). O VDR é codificado por um único gene localizado no cromossomo 12 em humanos e no cromossomo 7 em ratos, o qual pode ser regulado por fatores ambientais, genéticos ou epigenéticos (Szpirer et al. 1991; Saccone et al. 2015). A estrutura molecular do VDR consiste em 5 domínios (A-E) agrupados em 4 regiões funcionais distintas (Figura 6A), das quais duas se destacam: a região que abriga o domínio de ligação ao DNA (DBD: 24-89 aa, região C), localizada próximo a porção amino-terminal do receptor e que é composta por dois dedos de zinco responsáveis pelo reconhecimento de regiões específicas do DNA nos genes-alvo; e a região localizada na porção carboxi-terminal e que

abriga o domínio de ligação ao ligante (LBD: 126-427 aa; região E), o qual é responsável pelo acoplamento do $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ e que também apresenta porções que permitem a heterodimerização do VDR com o receptor retinoide X (RXR) e posterior interação com moléculas co-reguladoras (Mangelsdorf et al. 1995; Haussler et al. 1997; Molnár, 2014).

A ligação da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ ao VDR no domínio LBD induz uma mudança na conformação desse receptor e posterior heterodimerização com uma das isoformas do RXR (α , β , γ). Esse complexo ligante-VDR/RXR acopla-se em locais específicos do DNA, conhecidos como elementos responsivos à vitamina D (VDRE) (Figura 6B, C), geralmente presentes na região promotora dos genes-alvo, modulando a atividade de genes envolvidos em diversas funções biológicas. O sentido da regulação da transcrição gênica (ativação ou inibição) é direcionado pelas proteínas co-ativadoras (como NCoA-62 e alguns membros da família SRC – *steroid receptor coactivator*) e co-repressoras (como NcoR – *nuclear receptor corepressor* e SMRT – *silent mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*), recrutadas pelo complexo após acoplamento ao VDRE (Haussler et al. 1997; McKenna & O'Malley, 2002). Este recrutamento varia de acordo com o tipo celular e/ou gene-alvo de regulação, possibilitando assim, um efeito seletivo da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ via seu receptor VDR. Além da via genômica, a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ pode ainda se ligar ao VDR localizado em cavéolas na membrana plasmática, também conhecido como mVDR, desencadeando uma resposta intracelular rápida por meio da indução de canais iônicos, do controle do influxo de cálcio (Ca^{2+}) no citoplasma e da ativação de segundos mensageiros, como IP_3 , DAG, AMP cíclico, fosfolipase C, entre outros (Huhtakangas et al. 2004; Nemere et al. 2004).

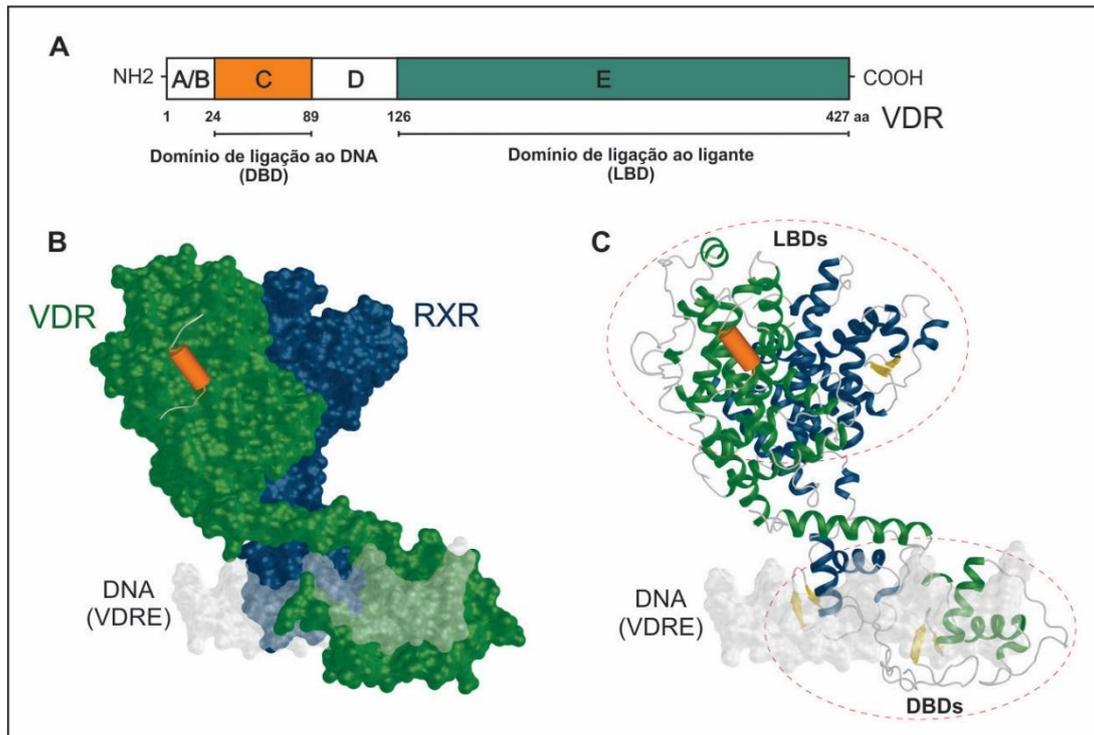


Figura 6 | Estrutura molecular do receptor de vitamina D e do complexo VDR/RXR. (A) Estrutura esquemática do VDR com seus respectivos domínios funcionais. **(B)** Representação da estrutura cristalina do heterodímero VDR(verde)/RXR(azul) acoplado a regiões específicas do DNA (VDRE). **(C)** Organização molecular dos componentes do mesmo complexo VDR/RXR destacando os domínios LBDs e DBDs e a possível localização de um peptídeo co-regulador (laranja). Adaptado de Molnár, 2014.

Um fato que possibilita a expressiva gama de funções desempenhadas pela $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ (vide item 2.3) é a ampla distribuição de seu receptor VDR. Inicialmente, a expressão de VDR foi identificada nos principais sítios de ação da vitamina D conhecidos, como os rins, glândulas paratireoides, intestino e osso. Atualmente, já se sabe que quase todas as células do organismo expressam VDR e que este receptor está presente nos diferentes sistemas fisiológicos, reforçando assim a participação da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ na regulação da homeostase sistêmica.

No sistema genital masculino tanto de humanos quanto de roedores e aves, a expressão de VDR tem sido identificada principalmente no testículo, epidídimo, vesícula seminal e próstata (Johnson et al. 1996; Dornas et al. 2007; Blomberg Jensen et al. 2010; Mahmoudi et al. 2012). Além disso, a vitamina D pode ser metabolizada localmente nestes órgãos, uma vez

que as enzimas que participam de seu metabolismo são expressas ao longo de todo o trato genital masculino, sendo que altas concentrações de seus metabólitos 25(OH)D₃, 1α,25(OH)₂D₃ e 24,25(OH)₂D₃ foram detectados no sistema genital de ratos após administração de 25(OH)D₃ radiomarcado com trítio [³H], entretanto com consideráveis diferenças de concentração entre os órgãos (Kidroni et al. 1983; Blomberg Jensen et al. 2010). Tal fato somado a ampla distribuição de VDR no sistema genital masculino, reforça a participação da vitamina D na manutenção da atividade reprodutiva.

2.3 Funções da 1α,25(OH)₂D no organismo

A função clássica da 1α,25(OH)₂D agindo via VDR é a regulação da homeostase de Ca²⁺, o cátion mais abundante do organismo e que desempenha papel importante não só na formação e manutenção do esqueleto ósseo, mas também atuando como mensageiro em processos fundamentais para o organismo, tais como neurotransmissão, contração muscular, síntese e secreção de hormônios, proliferação, diferenciação e morte celular (Berridge et al. 2003; Hoenderop et al. 2005). Esta ação da 1α,25(OH)₂D se dá principalmente pela modulação da expressão e atividade de proteínas envolvidas no transporte de cálcio através do epitélio (transporte transcelular), especialmente TRPV5 e TRPV6 (*transient receptor potential cation channel, subfamily V, members 5 e 6*), calbindinas, PMCA (*plasma membrane Ca²⁺ ATPase*) e NCX1 (*Na⁺/ Ca²⁺ exchanger 1*) (Fleet et al. 2002; Okano et al. 2004; Hoenderop et al. 2005). Essa modulação é tão importante para manter os níveis plasmáticos adequados desse íon que apenas 10 a 15% do Ca²⁺ oriundo da dieta é absorvido no intestino delgado sem a ação deste hormônio (Holick, 2006). Neste cenário, além da vitamina D em sua forma hormonal, o PTH e a calcitonina também desempenham papéis importantes na manutenção dos níveis adequados de Ca²⁺ nos meios extracelular e intracelular.

Nas últimas décadas, um número expressivo de trabalhos vêm demonstrando que a 1α,25(OH)₂D é essencial não apenas para homeostase mineral e integridade óssea, mas também em várias funções fisiológicas incluindo a regulação da síntese e secreção de hormônios, como o PTH e a insulina, modulação do sistema imune e do desenvolvimento

cerebral, controle da função cardíaca e da pressão arterial, além de regular os processos de diferenciação e proliferação celular em variados tipos celulares e participação da manutenção da atividade reprodutiva (Bourlon et al. 1997; Li et al. 2002; van Etten & Mathieu, 2005; Liu et al. 2006; Marini et al. 2010; Blomberg Jensen, 2014). Desse modo, tem sido atribuído à vitamina D um papel central na regulação da homeostase sistêmica, sendo essencial ao longo de toda a vida para prevenção de várias doenças, tais como diabetes mellitus, câncer, doenças cardiovasculares, ósseas, autoimunes e até mesmo a infertilidade humana.

Na atividade reprodutiva, estudos desde a década de 80 já demonstravam que uma deficiência de vitamina D em ratos desencadeava uma marcante redução nas taxas de fertilidade, tanto em fêmeas quanto em machos (Halloran & DeLuca, 1980; Kwiecinski et al. 1989). Atualmente, as funções exercidas pela vitamina D no sistema genital já são melhor elucidadas e, mais especificamente nos machos, a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ tem sido indicada como um importante hormônio participante da manutenção da função testicular e das glândulas sexuais acessórias, além de estar envolvido na regulação da biossíntese de estrógenos (Kinuta et al. 2000; Blomberg Jensen, 2014). Recentemente, a expressão de elementos envolvidos com a sinalização de vitamina D nos espermatozoides humanos, como o VDR e as enzimas que metabolizam a vitamina D, incluindo a CYP24A1, tem sido sugerida como um novo marcador da qualidade do sêmen (Blomberg Jensen et al. 2012). Além disso, os espermatozoides de homens com insuficiência ($\leq 50\text{nmol/L}$) ou deficiência ($\leq 25\text{nmol/L}$) de vitamina D [$25(\text{OH})\text{D}$] apresentam baixa motilidade quando comparados com aqueles de homens com níveis circulantes adequados de tal vitamina (Blomberg Jensen et al. 2012; Yang et al. 2012). Este fato pode ser explicado pelo aumento rápido de Ca^{2+} intracelular induzido pela $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, elevando assim, a motilidade dos espermatozoides (Blomberg Jensen et al. 2012; Blomberg Jensen, 2014).

3. RELAÇÃO ENTRE VITAMINA D, PRÓSTATA E ENVELHECIMENTO

Após evidências em modelos animais de que a vitamina D poderia ser importante para a manutenção da atividade reprodutiva, muitos estudos focaram em identificar quais tecidos do sistema genital seriam alvos de regulação dessa vitamina. Na próstata, Schleicher et al. (1989) foram os primeiros a detectarem sítios de ligação para a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, tanto no

epitélio quanto no estroma prostático de camundongos. Posteriormente, o VDR foi detectado *in vitro* em diversas linhagens de células prostáticas (Miller et al. 1992; Skowronski et al. 1993), bem como em tecido de rato (Johnson et al. 1996; Kivineva et al. 1998) e humano (Kivineva et al. 1998; Krill et al. 2001; Hendrickson et al. 2011; Giangreco et al. 2015). Atualmente, já se sabe que além de expressar VDR, tanto a próstata de roedores (camundongo e rato) quanto a próstata humana, são capazes de metabolizar localmente a vitamina D por possuírem a maquinaria enzimática necessária, principalmente as enzimas CYP27B1 e CYP24A1 (Blomberg Jensen et al. 2010; Mahmoudi et al. 2012; Giangreco et al. 2015). Portanto, acredita-se que este órgão seja regulado não só por andrógenos e estrógenos, mas também pela $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ produzida localmente ou oriunda da circulação sanguínea, a qual agindo via VDR pode participar da regulação tanto da atividade secretora glandular quanto do crescimento e diferenciação das células prostáticas (Skowronski et al. 1993; Johnson et al. 1996; Swami et al. 2011).

Sabe-se que a idade é o principal fator de risco primário para a ocorrência de duas importantes desordens proliferativas na próstata, a HPB e o câncer de próstata. Ambas patologias possuem alto impacto na saúde pública e acometem homens com idade acima de 50 anos (Lackzo et al. 2005; Begley et al. 2008). Em especial, o adenocarcinoma de próstata é o tipo mais comum de câncer que acomete homens no mundo inteiro, principalmente os idosos, uma vez que cerca de $\frac{3}{4}$ dos casos ocorrem a partir dos 65 anos de idade (INCA, 2015). No Brasil, esse é o segundo tipo de câncer mais prevalente na população masculina, atrás apenas do câncer de pele não-melanoma, e segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se cerca de 61.200 novos casos para 2016, número este que ultrapassa a estimativa para o mesmo ano de 57.960 novos casos de câncer de mama em mulheres (INCA, 2015).

Interessantemente, a deficiência de vitamina D é uma condição comum em indivíduos com idades mais avançadas, seja pelo hábito de vida das pessoas idosas, que geralmente se expõe menos ao sol, e/ou por elas apresentarem reduzida concentração epidérmica do 7-DHC (MacLaughlin & Holick, 1985), somado à redução da atividade 1α -hidroxilase da enzima CYP27B1, observada *in vitro* nas células da HPB e do câncer de próstata, o que pode resultar em baixos níveis do metabólito ativo da vitamina D, limitando assim, as ações benéficas deste hormônio no tecido prostático senil (Hsu et al. 2001; Swami et al. 2011). Neste cenário, um

número crescente de investigações tem apontado a vitamina D como um importante fator preventivo na ocorrência e progressão dessas doenças, especialmente se tratando do câncer de próstata.

Inicialmente, Schwartz & Hulka (1990) propuseram que a deficiência de vitamina D eleva o risco de câncer de próstata, baseando-se nos critérios de que a incidência desta patologia maligna é maior com o avançar da idade, em indivíduos que residem em regiões de altas latitudes (mais ao norte do planeta) e também em homens negros, todos estes considerados grupos propícios a apresentarem deficiência de tal vitamina. Posteriormente, diversos autores corroboraram essa hipótese sugerindo que o alto nível de vitamina D, geralmente mensurada como 25(OH)D, configura-se como um fator importante na prevenção de tal doença (John et al. 2005; Trump et al. 2010; Krishnan & Feldman, 2011; Swami et al. 2011; van der Rhee et al. 2012). De fato, os efeitos protetores associados à vitamina D no tecido prostático ocorre através da ligação da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ ao VDR e posterior regulação da transcrição de vários genes (alguns representados na figura 7), os quais podem induzir a parada de crescimento e apoptose, promover a diferenciação celular, bem como suprimir inflamação, metástase e angiogênese (Hsu et al. 2001; Chen & Holick, 2003; Krishnan & Feldman 2011; Swami et al. 2011).

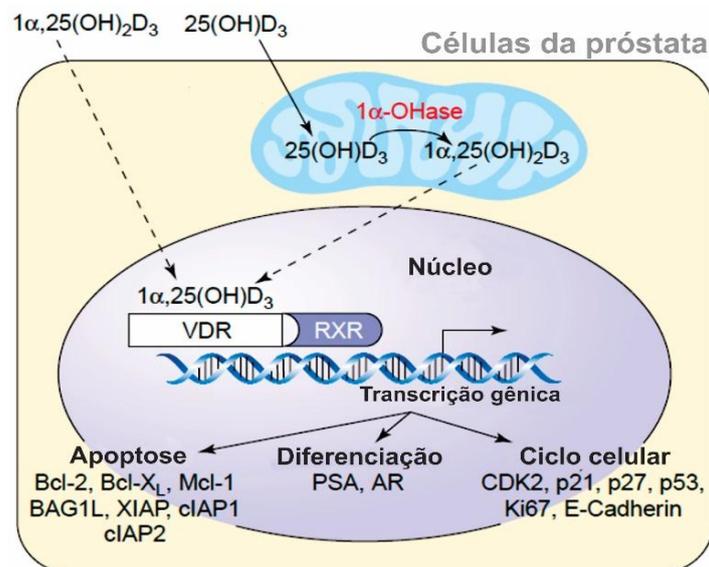


Figura 7 | Atividade da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ nas células prostáticas via seu receptor VDR.

O metabólito ativo da vitamina D desempenha papéis protetores no tecido prostático através da regulação da transcrição de vários genes envolvidos com os processos de apoptose, diferenciação ou ciclo celular. Adaptado de Chen & Holick, 2003.

Além dos níveis de vitamina D e da atividade das CYPs participantes de seu metabolismo enzimático, outro fator que tem sido relacionado com a incidência e progressão não só do adenocarcinoma prostático, mas também de outros cânceres, é a presença de polimorfismos do tipo SNPs (do inglês *single nucleotide polymorphisms*) no gene do VDR. Mais de sessenta tipos de polimorfismos já foram identificados neste gene, os quais podem ocorrer na região promotora, nos éxons 2 – 9 e ao redor deles (íntrons), bem como na região 3' UTR do gene. A importância destes polimorfismos na incidência de doenças não foi totalmente explorada, e neste cenário, apenas poucos polimorfismos já foram avaliados em virtude da complexidade de estudo (Köstner et al. 2009). Imagina-se que alguns desses polimorfismos possam alterar de alguma forma a expressão e/ou a funcionalidade do VDR, influenciando assim, a sinalização da vitamina D nos tecidos-alvo. Por exemplo, o polimorfismo Fok I (timina/citosina) localizado próximo a região 5' UTR do gene, altera o códon de início (do inglês *start codon*) da tradução (ATG ↔ ACG) e resulta na codificação de uma proteína VDR mais curta ou mais longa, dependendo do *start codon* a ser alterado, sendo esta alteração associada com a ocorrência de câncer de próstata, principalmente nos estágios mais avançados da doença (Xu et al. 2003; John et al. 2005; Köstner et al. 2009).

Embora haja evidências de que $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}/\text{VDR}$ exerça importante papel na fisiopatologia da próstata, e que tanto a redução dos níveis circulantes de vitamina D, comuns na senescência, quanto modificações na estrutura do VDR se correlacionam positivamente com o crescimento anormal do tecido prostático, pouco se sabe sobre a ocorrência de variação idade-dependente na expressão de VDR ou dos níveis de vitamina D na próstata. Além disso, a maioria dos estudos relacionando a expressão do VDR na próstata foi conduzida *in vitro*. Esse fato nos motivou a executar tal investigação como o primeiro passo no sentido de entender o papel fisiopatológico desse complexo sistema hormonal na próstata em envelhecimento.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Mapear a expressão do receptor de vitamina D (VDR) no complexo prostático de ratos em envelhecimento, correlacionando estes resultados com os níveis plasmáticos e intraprostáticos de vitamina D e o desenvolvimento de alterações histopatológicas locais comuns na velhice.

2. Objetivos específicos

- Determinar o peso absoluto e relativo dos diferentes lobos prostáticos dos animais experimentais;
- Mapear a distribuição do receptor de vitamina D (VDR) por imunohistoquímica e avaliar se a sua expressão no complexo prostático altera com o envelhecimento;
- Determinar os níveis plasmáticos e intraprostáticos da vitamina D total [25(OH)D] pelo ensaio de ELISA;
- Correlacionar os níveis mensurados de vitamina D com a expressão do VDR nos lobos prostático de ratos em diferentes idades.

III. METODOLOGIA

III. METODOLOGIA

1. Animais experimentais

Ratos Wistar machos sexualmente maduros, com 3, 6, 12, 18 e 24 meses de idade, foram utilizados neste estudo, totalizando 50 animais divididos igualmente entre os grupos experimentais. Os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos em estantes climatizadas no biotério do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, sob condições de iluminação e temperatura constantes (12 horas de claro e 12 horas de escuro a 22°C), recebendo água e ração comercial peletizada *ad libitum* (Nuvilab CR1, Quimtia Inc.). Todos os procedimentos experimentais descritos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA, processo 286/2008).

2. Coleta e preparação dos tecidos

Após atingirem as respectivas idades de interesse, os animais foram pesados e então sacrificados pela administração intraperitoneal de anestésico em concentração letal (pentobarbital sódico 50mg/Kg e cloridrato de quetamina 10mg/kg), precedido de heparinização. Imediatamente antes da eutanásia, amostras de sangue para dosagem dos níveis plasmáticos de vitamina D foram coletadas por punção cardíaca e colocadas em tubos revestidos com heparina. Para os estudos imunohistoquímicos, os animais foram perfundidos via transcardíaca com solução salina e formalina neutra tamponada (NBF) a 10%, ou apenas com solução salina para os estudos de dosagem hormonal intraprostática e *Western blotting*. Em seguida, os lobos prostáticos foram dissecados, pesados e destinados à inclusão em parafina para a técnica de imunohistoquímica, ou então congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C, para serem utilizadas nos ensaios de *Western blotting* e ELISA. Vale ressaltar que para a análise do peso dos diferentes lobos prostáticos, considerou-se apenas os valores obtidos na amostragem do tecido fresco, de modo a reduzir interferências causadas pelo fixador utilizado.

3. Imunohistoquímica

Com o intuito de mapear a distribuição celular e subcelular do VDR e avaliar seu padrão de expressão no complexo prostático de ratos em diferentes idades (3 – 24 meses, n= 5 por grupo), através da técnica de imunohistoquímica indireta, cortes de 5µm de espessura dos fragmentos de tecidos fixados em NBF 10% e incluídos em parafina foram inicialmente desparafinizados em xilol, hidratados em série decrescente de etanol e submetidos ao bloqueio de peroxidase endógena com solução de metanol/H₂O₂ 0,6% por 30 min. A seguir, os mesmos foram submetidos à recuperação antigênica em solução tampão citrato de sódio 0,01M e pH 6.0, aquecidos em forno micro-ondas por 30 min (6 x 5' na potência 70). Após esfriamento e lavagem em tampão fosfato (PBS, pH 7.4), procedeu-se o bloqueio de avidina e biotina endógenas usando kit comercial de bloqueio (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), anterior ao bloqueio de ligações inespecíficas por meio de soro normal de coelho a 10% por 1 hora. Na etapa seguinte, os cortes foram incubados por aproximadamente 40 horas a 4°C com o anticorpo primário monoclonal anti-VDR (clone 9A7y, Thermo Scientific, Fremont, CA, EUA), diluído 1:1500 em PBS. Como controle negativo da técnica, os cortes foram incubados apenas com PBS em substituição aos anticorpos primários. Após lavagens em PBS, realizou-se a incubação com anticorpo secundário biotilado coelho anti-rato (Dako, Carpinteria, CA, EUA), por 1 hora, seguido de incubação do complexo avidina-biotina (Vectastain Elite ABC Kit – Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) para amplificação do sinal. Por fim, a imunomarcação foi visualizada através da reação com 3,3'-diaminobenzidina contendo 0,01% de peróxido de hidrogênio em tampão Tris-HCl 0,05M e pH 7.6. Posteriormente, os cortes foram levemente contracolorados com hematoxilina de Meyer, desidratados em série crescente de etanol, diafanizados em xilol e as lâminas montados para posterior observação e documentação. Os ensaios imunohistoquímicos foram realizados em triplicata para cada lobo prostático.

4. Extração de proteínas totais

Os tecidos prostáticos de ratos de 3 – 24 meses de idades (n= 5 por grupo) foram congelados em nitrogênio líquido e macerados em gelo seco, e o pulverizado (100mg de tecido) foi homogeneizado em 300µL de tampão de extração [Uréia 8M, 10% de inibidores de

proteases (*Protease Inhibitor Cocktail* – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), Tris-HCl 20mM e pH 7.5, e EDTA 0,5mM e pH 8.0]. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 10 min a 14.000g e temperatura de 4°C, e a fração sobrenadante onde se encontravam as proteínas extraídas foi recolhida e armazenada a -80°C. A concentração proteica das amostras foram determinadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Fremont, CA, EUA), imediatamente anterior à utilização das mesmas nas análises de *Western blotting*.

5. Western blotting

Ensaio de *Western blotting* foram realizados nos lobos ventral, dorsal, lateral e anterior da próstata de ratos em diferentes idades (3 – 24 meses, n= 5 por grupo), com o objetivo de confirmar a especificidade dos anticorpos utilizados na imunohistoquímica e também para avaliar os níveis proteicos do receptor de vitamina D ao longo do envelhecimento. Para isso, a mesma quantidade de proteínas (40µg) por grupo foi diluída em tampão de amostra contendo sódio dodecil-sulfato 1%, Tris-HCl 30 mM pH 6.8, 2-mercaptoetanol (1x), glicerol 12% (v/v) e azul de bromofenol 0,1%. Após banho sônico e fervura, por 10 e 5 min, respectivamente, as amostras foram submetidas à eletroforese contínua em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), seguido de transferência para membrana de nitrocelulose para a realização do *imunoblot*. Após bloqueio com soro normal de coelho 10%, as membranas foram incubadas em câmara fria *overnight* com anticorpo primário monoclonal anti-VDR (clone 9A7y, Thermo Scientific, Fremont, CA, EUA), diluído 1:1000 em PBS. Após lavagens em PBS-Tween 0,05%, realizou-se a incubação com anticorpo secundário biotilado coelho anti-rato (Dako, Carpinteria, CA, EUA), diluído 1:1000 em PBS, por 1 hora na temperatura ambiente, seguido de incubação do complexo avidina-biotina (Vectastain Elite ABC Kit – Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), para amplificação do sinal. Por fim, após lavagens com PBS-Tween 0,05%, a marcação foi visualizada por meio da solução de 0,1% de 3,3' diaminobenzidina em PBS contendo 0,05% de cloronaftol, 9% metanol e 0,04% de H₂O₂. Os ensaios foram realizados em duplicata em três experimentos independentes para cada lobo prostático avaliado, e em todos os ensaios utilizou-se a β-actina como controle interno.

6. Intensidade de imunomarcção para VDR

A avaliação dos níveis totais de VDR no complexo prostático de ratos ao longo do envelhecimento foi realizada através da análise densitométrica das bandas correspondentes às membranas de *Western blotting*, seguindo metodologia previamente estabelecida (Oliveira et al. 2007). Os valores estimados da intensidade do VDR foram normalizados com os valores encontrados para a β -actina (controle interno) e estão apresentados como expressão relativa de VDR.

Visando uma avaliação completa do padrão de expressão do VDR no complexo prostático de ratos Wistar, uma análise da estimativa da intensidade de imunomarcção desse receptor foi conduzida em diferentes regiões do epitélio glandular de todos os lobos prostáticos. Esta abordagem baseou-se no protocolo previamente estabelecido (Oliveira et al. 2007), seguindo as adaptações realizadas por Morais-Santos e colaboradores (2015), e configura-se como uma potente ferramenta para avaliar as variações locais de determinada proteína, variações estas que não são muitas vezes discriminadas por outras técnicas de proteômica, como o *Western blotting* (Morais-Santos et al. 2015). Para isso, as lâminas provenientes das preparações imunohistoquímicas foram processadas no scanner de lâminas 3DHISTECH disponível no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) ICB/UFMG. Inicialmente, imagens de diferentes regiões do epitélio glandular da VP, DP, LP e AP de cada animal foram obtidas no aumento de 40x, por meio do programa Panoramic Viewer (3DHISTECH, Budapeste, HU). Estas regiões epiteliais compreendem tanto as áreas de epitélio não-alterado (epitélio normal) quanto aquelas que apresentam alguma alteração, tais como atrofia, hiperplasia ou neoplasia intraepitelial prostática (PIN), quando houver. Após obtenção, as imagens foram processadas, utilizando o programa Adobe Photoshop CS6, sendo transformadas em escala de cinza e tendo o padrão de cores invertido, e em seguida, as mesmas foram transferidas para análise quantitativa no programa Image J (Figura 8). Nas imagens processadas, traçou-se a área do núcleo de uma célula luminal do epitélio, reativa para VDR e selecionada aleatoriamente, bem como a área nuclear das nove células luminiais consecutivas. Núcleos fora de foco não foram considerados nesta análise, e a intensidade média de pixels presente na área total dos núcleos selecionadas foi mensurada (Figura 8). A intensidade final de pixel utilizada nas análises quantitativas foi obtida subtraindo-se os

valores positivos medidos na área nuclear dos valores encontrados para o *background* (área negativa traçada adjacente à área positiva medida), e estão apresentados em escala de 0 – 100.

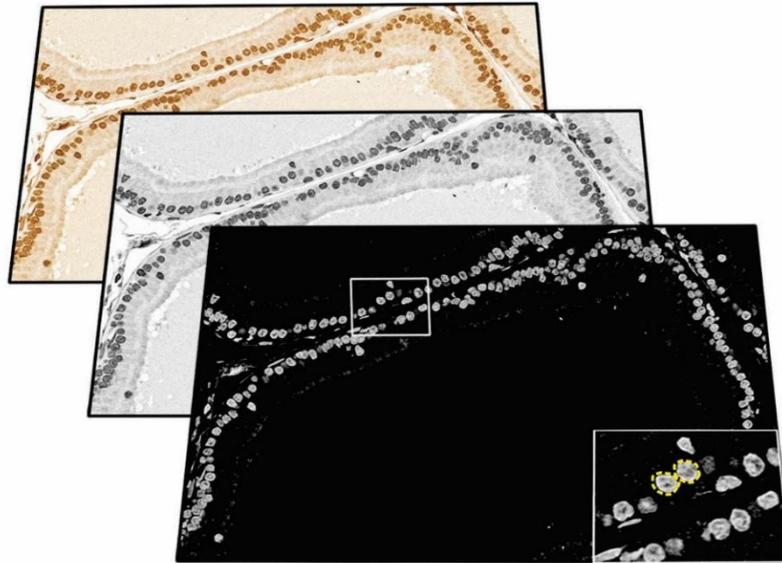


Figura 8 | Fluxograma do processamento de imagem para mensuração da intensidade média de pixel referente à imunomarcagem do VDR. A intensidade de imunomarcagem do VDR em diferentes regiões do epitélio prostático foi mensurada traçando a área nuclear das células luminiais (traçado descontínuo em amarelo).

Em todos os lobos prostáticos, os valores da estimativa de intensidade do VDR (descrito anterior) para as áreas alteradas (epitélio atrófico, hiperplásico ou PIN) foram comparados com aqueles obtidos para as áreas adjacentes de epitélio normal, conforme descrito por Morais-Santos et al. (2015). Adicional à avaliação dos ensaios de *Western blotting*, os níveis de intensidade do VDR no núcleo das células luminiais do epitélio da VP e DP foram também avaliados ao longo do envelhecimento. Para isso, selecionou-se cinco imagens de diferentes regiões contendo adenômeros com epitélio normal para cada animal. Em cada imagem, a intensidade média de pixel presente na área total de 10 núcleos provenientes das células luminiais foi mensurada conforme descrito anteriormente, e os valores obtidos da amostragem total (50 núcleos por animal) foram avaliados ao longo do envelhecimento. Além disso, uma possível diferença quanto à intensidade de VDR entre as células luminiais e basais do epitélio prostático foi investigada. Para isso, utilizou-se a mesma

abordagem descrita para mensuração da intensidade média de pixel, entretanto, mudando o processo de seleção. Portanto, em todas as imagens processadas contendo adenômeros com epitélio normal (Figura 8), células luminais e basais foram identificadas conforme aspectos morfológicos e a disposição das mesmas no epitélio prostático. Em seguida, a intensidade de pixel da área nuclear das células basais positivas para VDR, bem como das células luminais adjacentes a elas foram comparadas.

Por fim, a quantidade de células negativas para VDR no epitélio prostático foi determinada. Para isso, o número de células não-reativas para VDR em 20 células luminais no epitélio normal de cinco adenômeros selecionados aleatoriamente (três na periferia e dois centrais), foi mensurado com auxílio do programa Panoramic Viewer, totalizando 100 células por animal. Possíveis variações na proporção de células negativas para VDR com o envelhecimento foram investigadas em todos os lobos prostáticos. Adicionalmente, os valores obtidos nas áreas de epitélio normal de determinados animais foram comparados com o número de células não-reativas para VDR em 100 células presentes nas áreas de PIN dos mesmos animais. Os dados dessa análise foram apresentados graficamente como porcentagem de células negativas para VDR.

7. ELISA

Os níveis plasmáticos e teciduais de vitamina D total (vitaminas D₂ e D₃) em sua principal forma circulante, a 25(OH)D, foram determinados em duplicata e em dois ensaios independentes pela técnica de ELISA. Para isso, as amostras de plasma foram obtidas após centrifugação do sangue total coletado conforme descrito no item 2, durante 10 min a 3800 rpm, enquanto que para as preparações teciduais, 150 mg de tecido (próstata ventral) por amostra foi submetido ao protocolo de extração de hormônios esteroides, utilizando éter dietílico, conforme previamente estabelecido (Oliveira et al. 2013). Após processamento das amostras, os ensaios de ELISA foram realizados, seguindo as recomendações do fabricante dos kits comerciais (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany). A sensibilidade dos ensaios para 25(OH)D foi < 2,89 ng/mL.

8. Análise estatística

Os dados referentes ao peso corporal e dos lobos prostáticos, intensidade de expressão do VDR e níveis de vitamina D foram submetidos à análise estatística utilizando o GraphPad Prism 6.07 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Em cada grupo de dados em análise, foi traçado um gráfico Q-Q plot em conjunto com o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição dos valores. Em seguida, os dados que assumiram uma distribuição de Gaussian foram analisados utilizando o teste paramétrico t-Student, para análises entre dois grupos, ou por meio do teste ANOVA de um fator seguido do pós-teste Tukey para comparações múltiplas das médias entre três ou mais grupos. Caso contrário, o teste de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste Dunns foi adotado para análise entre dois ou mais grupos, respectivamente. Os dados provenientes destas análises foram apresentados graficamente como média \pm erro padrão da média (SEM). Além disso, vale ressaltar que anterior à análise do peso dos lobos prostáticos em relação à idade, a correlação existente entre o peso absoluto dos lobos e o peso corporal dos animais foi avaliada através do coeficiente de correlação de Pearson. Em todas as análises, diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p \leq 0.05$.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Peso corporal e do complexo prostático

A análise referente ao peso corporal dos animais revelou um aumento significativo dos 3 aos 6 meses de idade, mantendo-se estável até 24 meses (Figura 9). O coeficiente de correlação de Pearson indicou a existência de correlação positiva e significativa entre o peso corporal e o peso absoluto dos diferentes lobos prostático dos animais experimentais (Figura 10, $p \leq 0,05$), independentemente da idade. Desse modo, visando eliminar a influência que o peso do animal exerce sobre o peso da próstata, neste trabalho adotamos a medida de peso relativo (g/100g de peso corporal) calculada para os diferentes lobos prostáticos de cada animal experimental, que é expressa pela fórmula:

$$\frac{\text{Peso da próstata}}{\text{Peso corporal}} \times 100$$

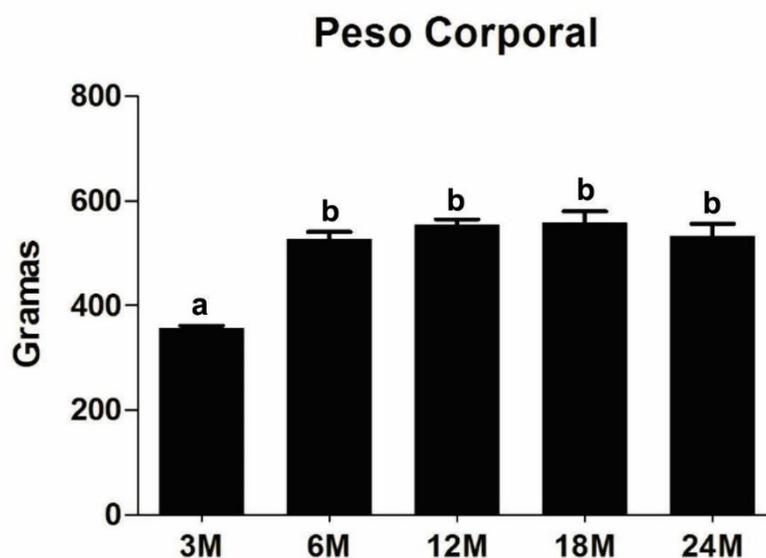


Figura 9 | Peso corporal de ratos Wistar de 3 a 24 meses de idade (M). Letras (a, b) indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$; $n = 10$).

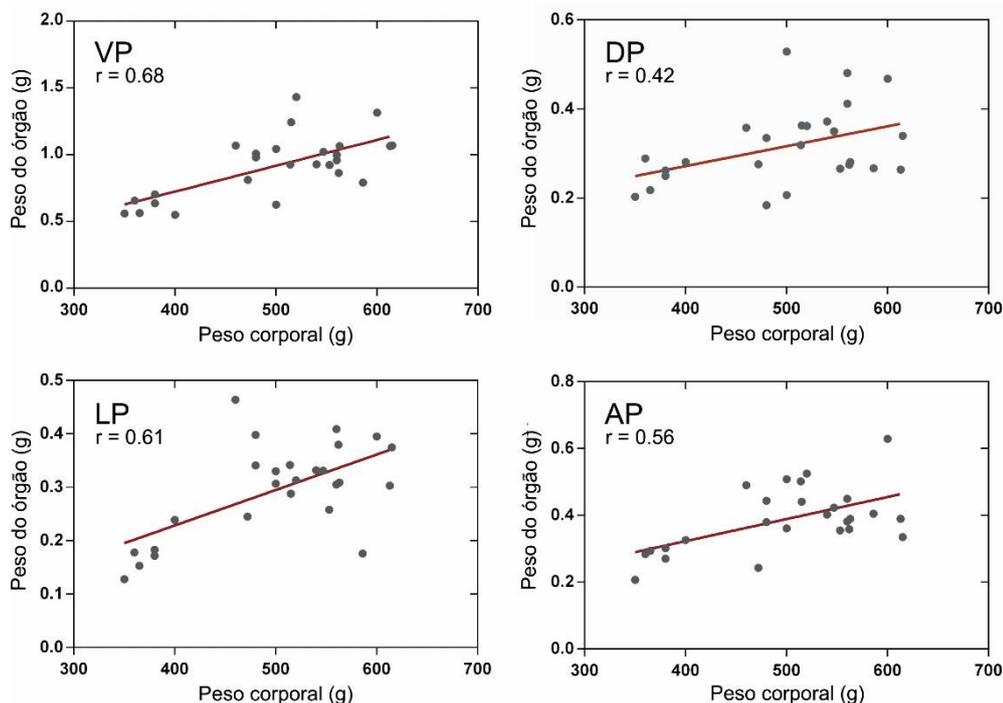


Figura 10 | Gráficos de dispersão representativos da correlação entre o peso corporal e o peso absoluto dos lobos ventral (VP), dorsal (DP), lateral (LP) e anterior (AP) dos animais experimentais. r = coeficiente de correlação de Pearson; $p \leq 0,05$; $n = 25$ por lobo.

Não foram observadas diferenças quanto ao peso relativo de todo o complexo prostático em relação às diferentes idades analisadas, permanecendo similar desde os 3 até os 24 meses de idade, como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1: Peso relativo dos lobos prostáticos de ratos Wistar em diferentes idades.

Idade (meses)	3	6	12	18	24
VP (g/100g PC)	0.157 ± 0.031	0.156 ± 0.036	0.154 ± 0.031	0.136 ± 0.024	0.167 ± 0.041
DP (g/100g PC)	0.039 ± 0.013	0.040 ± 0.013	0.028 ± 0.008	0.029 ± 0.010	0.038 ± 0.012
LP (g/100g PC)	0.034 ± 0.004	0.044 ± 0.012	0.042 ± 0.009	0.032 ± 0.013	0.035 ± 0.009
AP (g/100g PC)	0.066 ± 0.019	0.070 ± 0.016	0.063 ± 0.012	0.050 ± 0.004	0.055 ± 0.015

PC=peso corporal; VP=próstata ventral; DP=próstata dorsal; LP=próstata lateral; AP=próstata anterior. $P > 0,05$.

Quando analisados juntos, independentemente da idade dos animais, as próstatas ventral, dorsal, lateral e anterior constituem cerca de 54% ($0,154 \pm 0,032$), 12% ($0,035 \pm 0,011$), 13% ($0,037 \pm 0,010$) e 21% ($0,059 \pm 0,015$) da massa do complexo prostático de ratos Wistar.

2. Padrão de expressão do VDR no complexo prostático

Os ensaios imunohistoquímicos mostraram que o VDR está amplamente distribuído ao longo de todo o complexo prostático de ratos Wistar, independentemente da idade dos animais (Figura 11). Em todos os diferentes lobos prostáticos, intensa positividade para VDR foi detectada no epitélio glandular, bem como nas células do estroma e do endotélio vascular (Figuras 11). Já as células musculares lisas que circundam os adenômeros apresentaram imunorreatividade intensa, mas intermitente. Os ensaios também detectaram leve marcação para VDR no citoplasma das células epiteliais prostáticas, e nenhuma reação foi observada nas secções dos controles negativos (Figura 11). Contudo, é importante ressaltar algumas diferenças encontradas quanto à expressão do receptor de vitamina D no epitélio prostático.

Em relação ao padrão de expressão do VDR ao longo do envelhecimento, foi detectado um discreto, mas significativo, aumento da intensidade de marcação do receptor no núcleo das células luminais do epitélio normal das próstatas ventral e dorsal de animais de 12 – 24 meses de idade (Figura 12). Além disso, em todos os lobos prostáticos, muitas das células com localização e morfologia sugestivas de células basais apresentaram positividade mais intensa para o VDR quando comparado com as células luminais adjacentes, independentemente da idade dos animais (Figura 13). No entanto, é possível observar algumas dessas células com coloração moderada ou até mesmo negativas.

Não foi incomum encontrar células cilíndricas pouco reativas ou negativas para VDR no epitélio prostático (Figura 13), as quais apresentavam-se isoladas, em dupla ou em pequenos grupos). A proporção de células não-reativas para VDR no epitélio dos lobos prostáticos foi similar nas diferentes idades avaliadas (Figura 14A), mas variou consideravelmente de acordo com o lobo em análise. Nesse sentido, a próstata anterior apresentou o maior número de células epiteliais negativas para VDR, seguido das próstatas dorsal e lateral, as quais apresentaram quantidades similares, e da próstata ventral, o lobo

onde se encontrou a menor proporção dessas células (Figura 14B). Adicionalmente, o número de células não-reativas para VDR foi maior em áreas de PIN quando comparado com o epitélio normal adjacente (Figura 14C, 15).

Embora tenha sido observado padrão heterogêneo de marcação para VDR em áreas de PIN, onde a maior parte das células se cora normalmente, enquanto outras se coram mais fracamente ou apresentam-se negativas, não foi notada diferença na intensidade de marcação para VDR nas células positivas nessas áreas de alteração em relação ao epitélio normal, independentemente do lobo prostático analisado (Figura 15). O mesmo foi observado em áreas de pregueamento epitelial característico de hiperplasia, alteração mais frequente nos animais de 18 e 24 meses quando comparado com as demais idades (Figura 16). Áreas de atrofia epitelial, característica comum da próstata ventral a partir dos 12 meses de idade, também não apresentaram alteração quanto à expressão de VDR nas células positivas em relação ao epitélio normal adjacente, independentemente do grau de atrofia do epitélio (Figura 17).

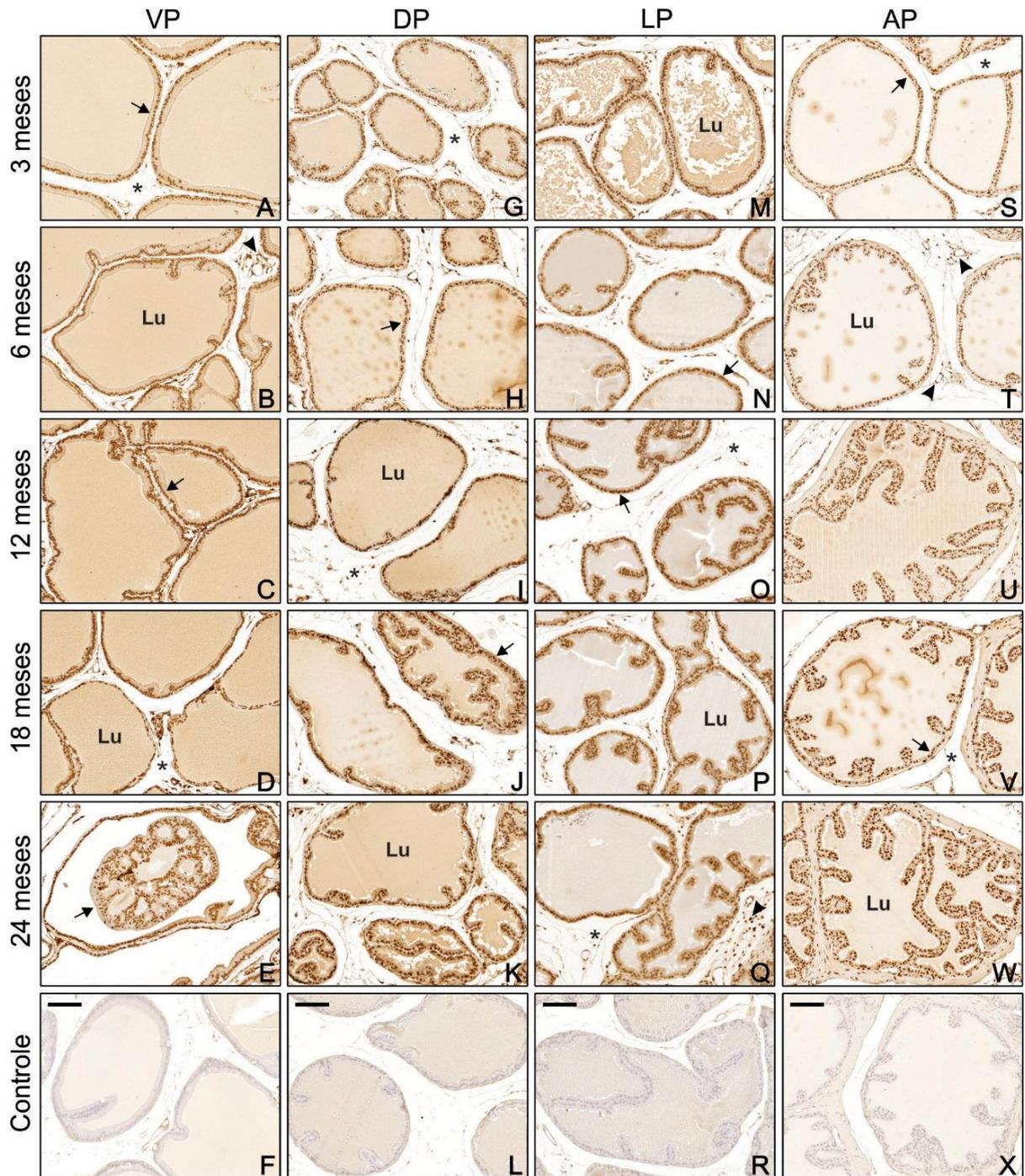


Figura 11 | Imunomarcção para VDR nas próstatas ventral (A – E), dorsal (G – K), lateral (M – Q) e anterior (S – W) de ratos em diferentes idades. Setas pretas = epitélio prostático reativo. Seta em (E) indicando proliferação de arquitetura cribiforme na próstata ventral. * = Estroma. Cabeça de seta em (Q) apontando infiltrado inflamatório positivo para VDR na próstata lateral. Cabeça de seta em (B e T) apontando endotélio vascular imunorreativo. Lu = Lume. VP = próstata ventral. DP = Próstata dorsal. LP = próstata lateral. AP = próstata anterior. (F, L, R e X) = Controles negativos da imunomarcção. Barra em (F, L, R e X) = 100 μ m.

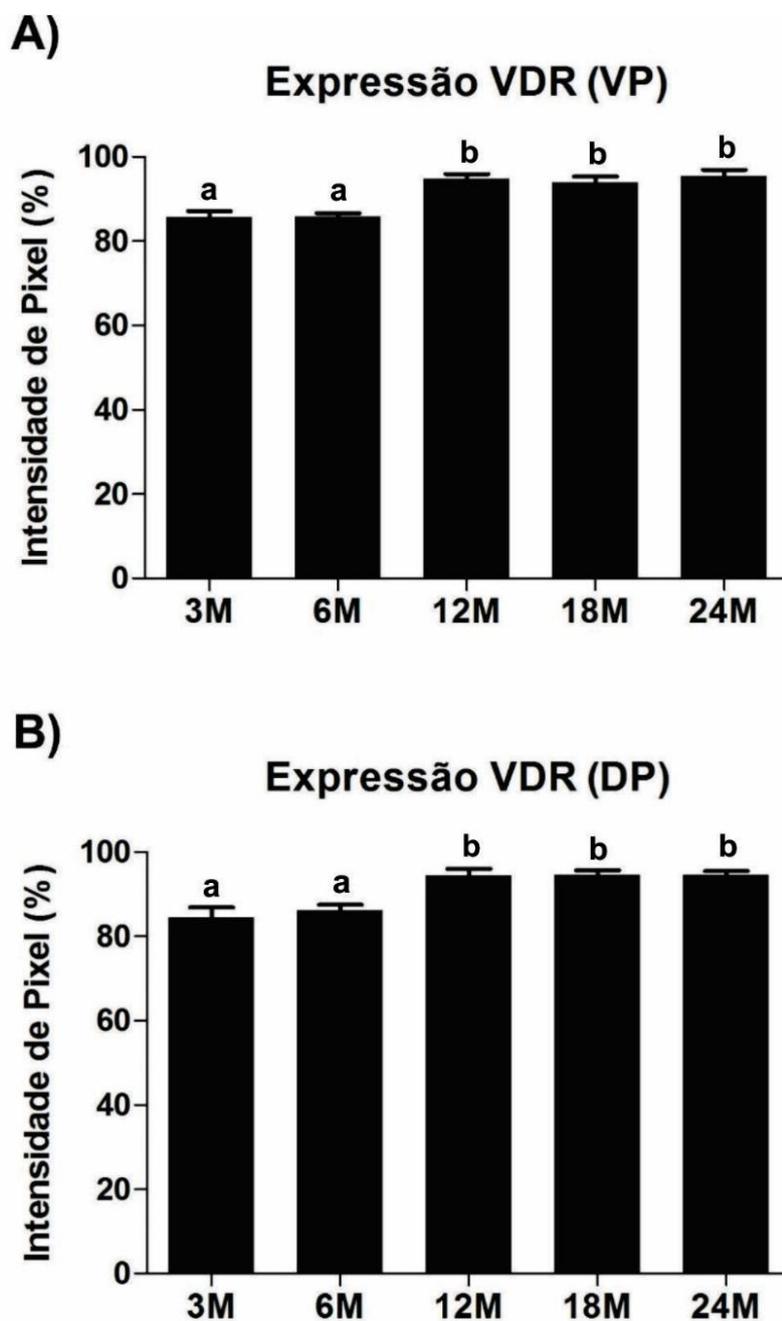


Figura 12 | Análise quantitativa da intensidade de expressão do VDR no epitélio das próstatas ventral (VP) e dorsal (D) de ratos Wistar ao longo do envelhecimento. Letras (a, b) indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$; $n = 5$).

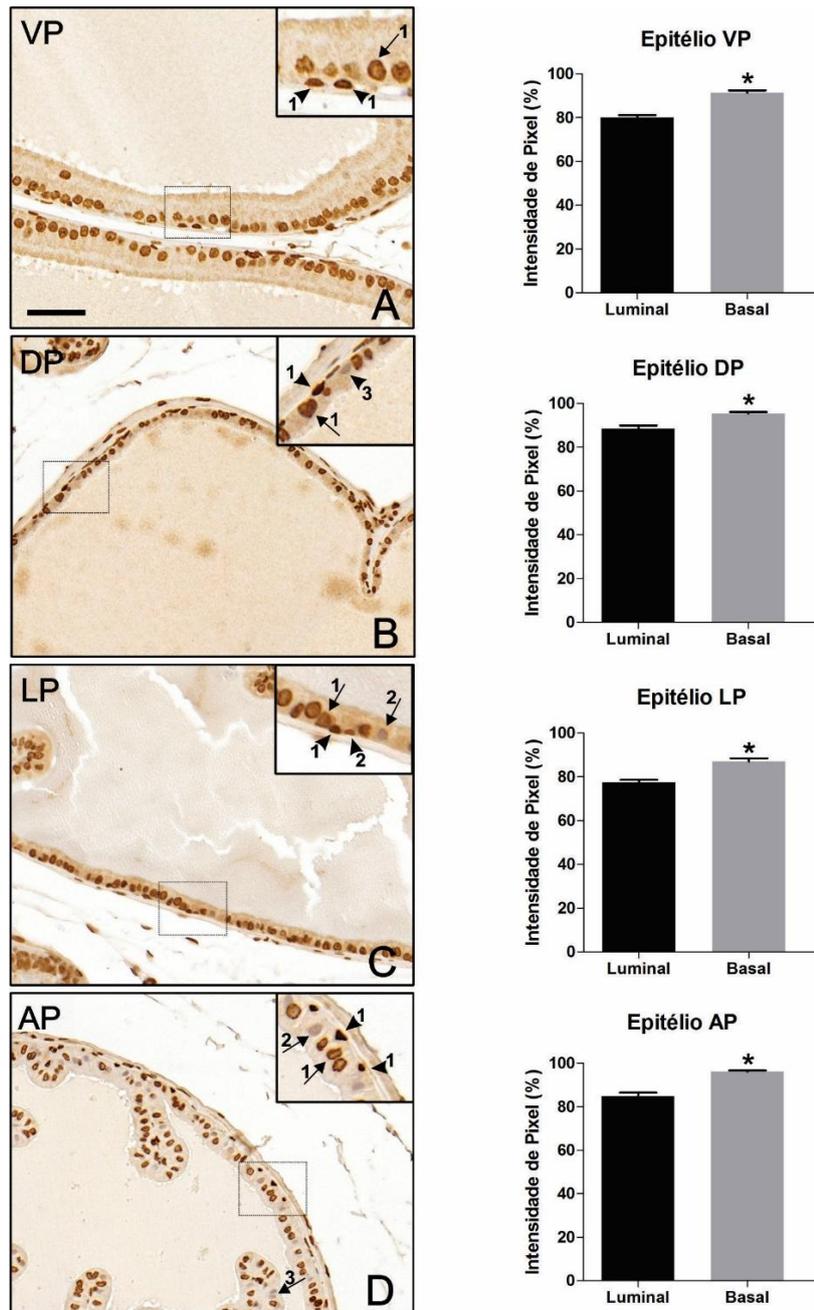


Figura 13 | Expressão de VDR nas próstatas ventral (A), dorsal (B), lateral (C) e anterior (D) destacando a imunomarcção entre as células basais (cabeças de setas) e as células luminais (setas). Note nos insertos de A – D muitas células basais apresentando coloração nuclear mais intensa para VDR (cabeças de setas 1) em relação às células luminais adjacentes positivas (setas 1), enquanto que outras podem ser semelhantes às células luminais por apresentarem coloração normal (cabeça de seta 2, inserto em C) ou até mesmo ser negativas (cabeça de seta 3, inserto em B). Células luminais negativas para VDR, solitárias ou em dupla, também foram indicadas (setas 2 e 3, respectivamente). A maior intensidade de marcação para VDR no núcleo das células basais foi confirmado pela análise quantitativa. Barra em (A) = 50 μ m. * = $P \leq 0,05$.

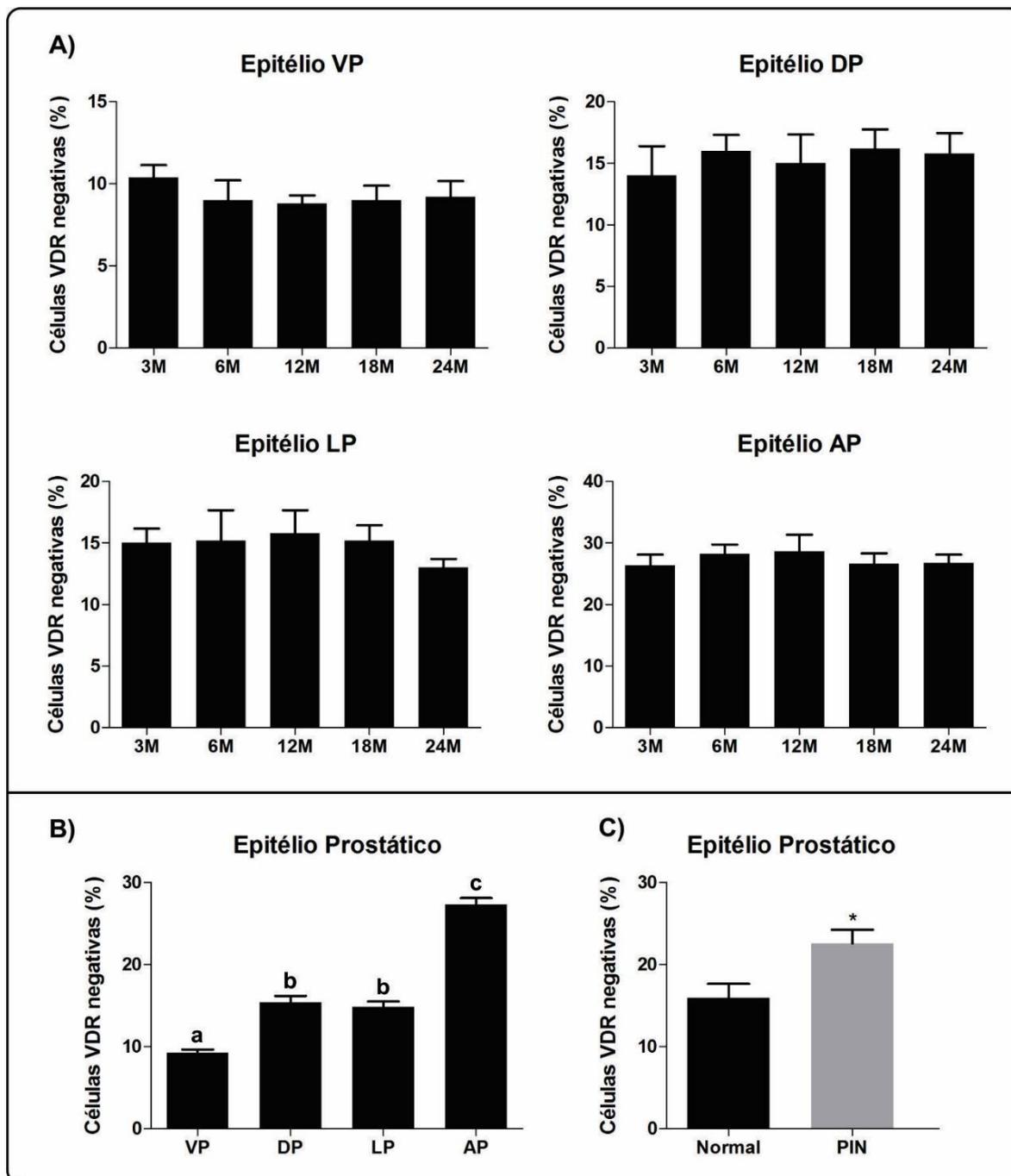


Figura 14 | Quantificação da proporção de células negativas para VDR no epitélio da próstata de ratos em relação à idade dos animais (A), aos lobos prostáticos e entre áreas de epitélio normal e PIN (C). VP = *próstata ventral*. DP = *Próstata dorsal*. LP = *próstata lateral*. AP = *próstata anterior*. PIN = *neoplasia intraepitelial prostática*. Letras (a, b, c) indicam diferença estatística entre três ou mais grupos ($p \leq 0,05$; $n = 5$). * = $P \leq 0,05$ entre dois grupos.

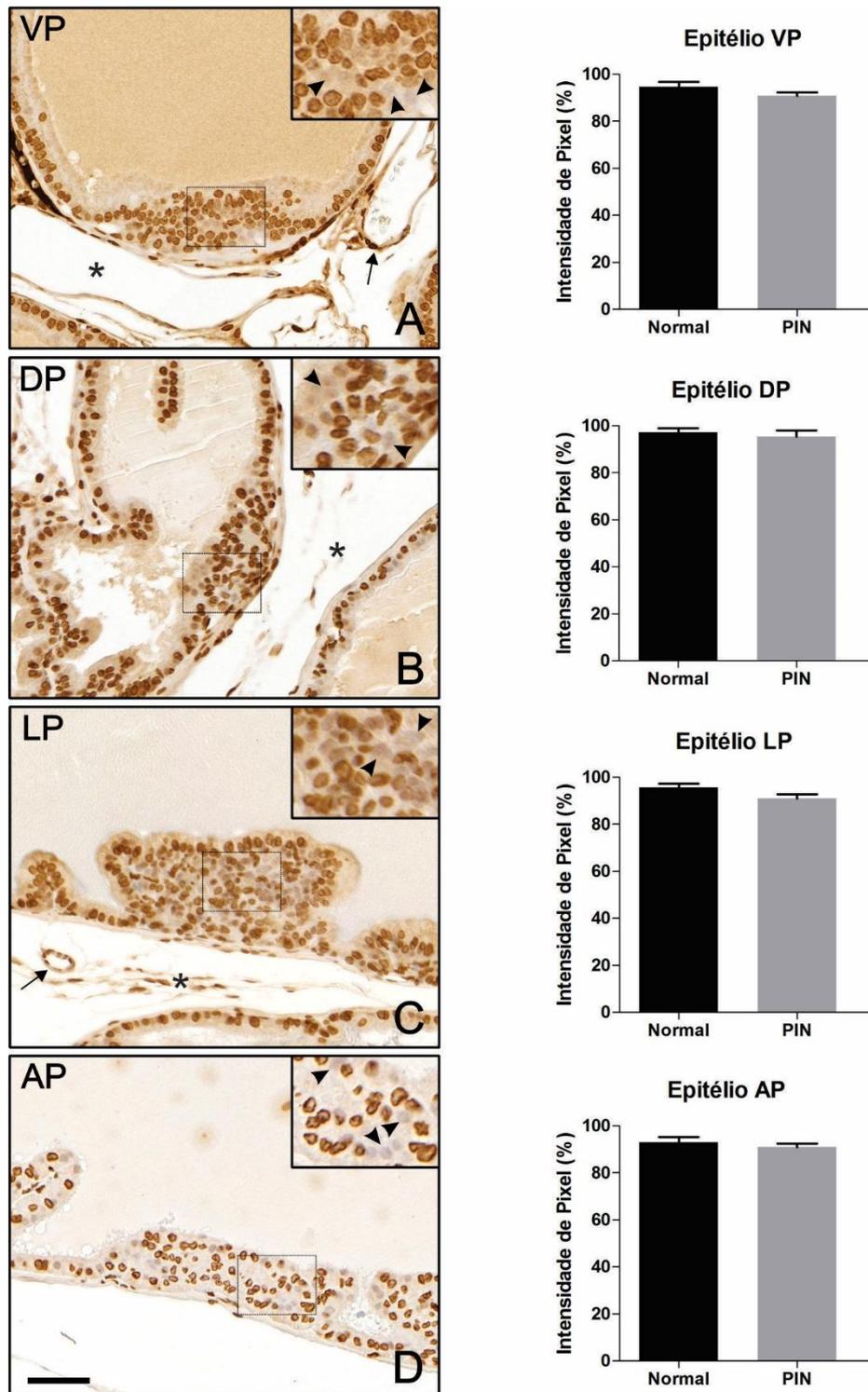


Figura 15 | Expressão de VDR nas próstatas ventral (A), dorsal (B), lateral (C) e anterior (D), destacando a imunomarcagem nas células da PIN. A análise quantitativa não detectou diferenças quanto à intensidade de VDR no núcleo das células imunorreativas da PIN em relação ao epitélio normal adjacente. Setas pretas = apontam o endotélio vascular imunorreativo. Cabeças de setas = indicam a presença de células negativas para VDR na PIN. * = Estroma. Barra em (D) = 50 μ m. $P > 0,05$.

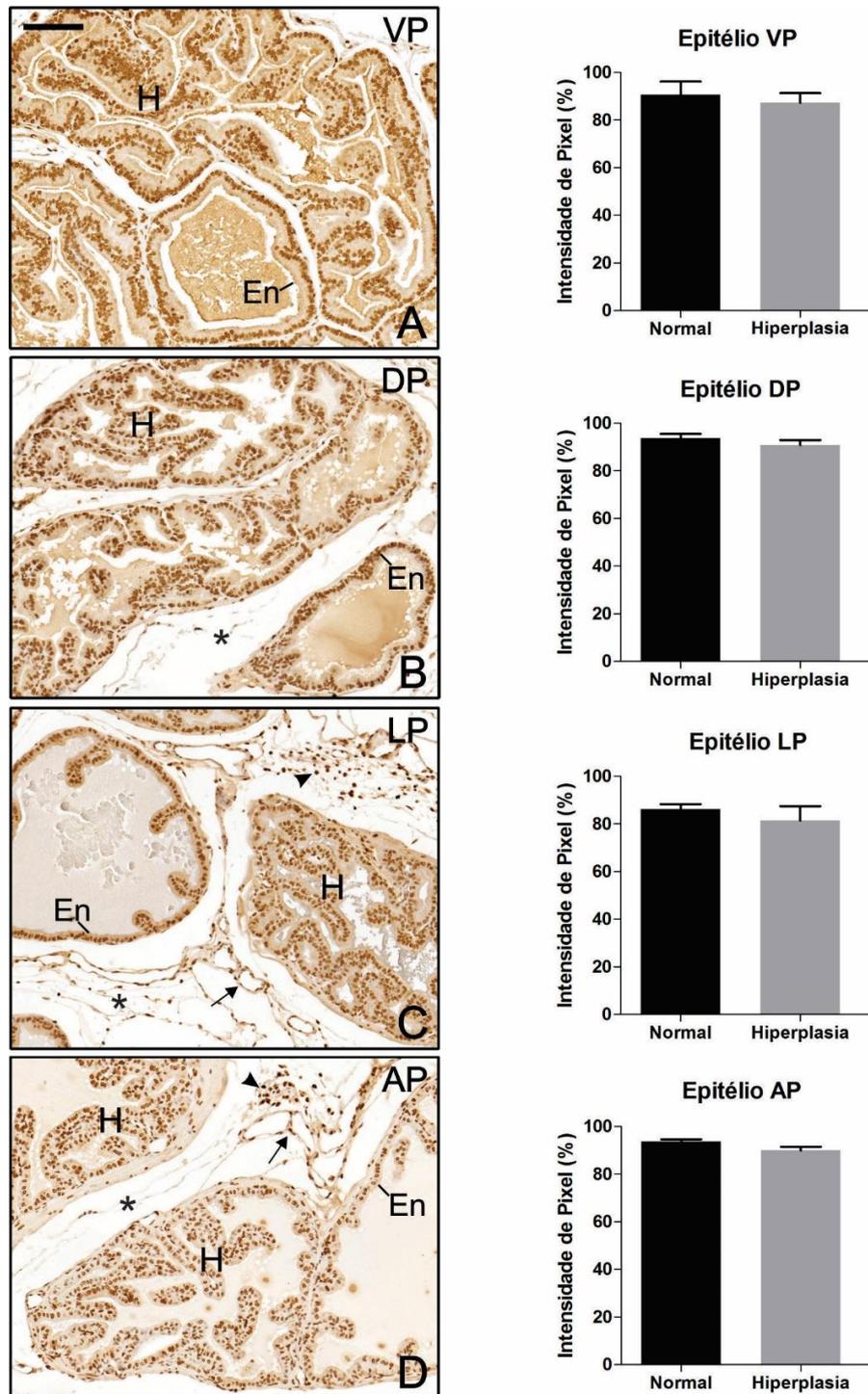


Figura 16 | Expressão de VDR nas próstatas ventral (A), dorsal (B), lateral (C) e anterior (D) de ratos de 18 a 24 meses de idade, comparando a imunomarcagem em áreas de pregueamento epitelial sugestivo de hiperplasia (H) em relação ao epitélio normal adjacente (En). A análise quantitativa não detectou diferenças quanto à intensidade de VDR nas células positivas nas regiões epiteliais investigadas.* = Estroma. Setas = apontam o endotélio vascular imunorreativo. Cabeças de setas = indicando a presença de infiltrado inflamatório reativo para VDR. Barra em (A) = 50 μ m. $P > 0,05$.

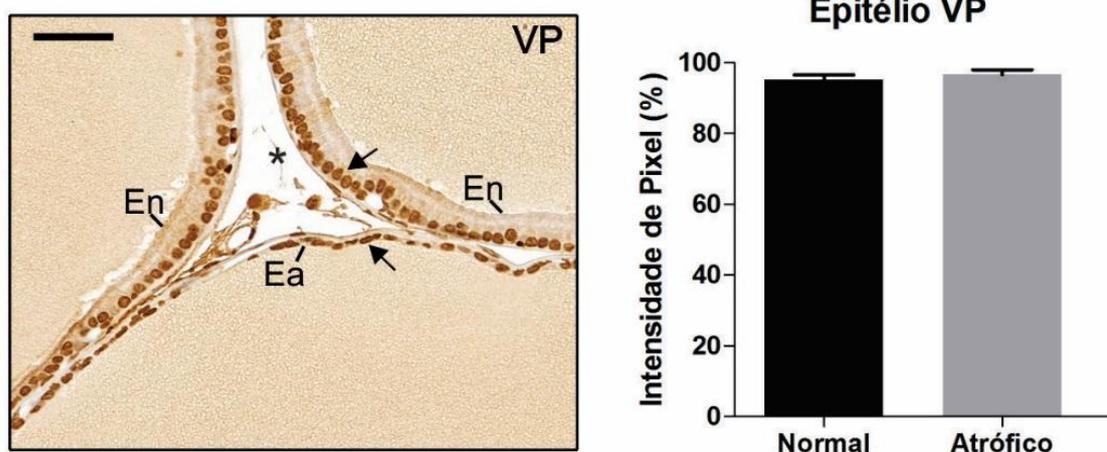


Figura 17 | Expressão de VDR na próstata ventral de ratos comparando a intensidade de imunomarcção entre o epitélio atrófico (Ea) e o epitélio normal adjacente (En). Setas pretas indicam células imunorreativas para VDR no epitélio prostático. * = Estroma. Barra em (A) = 50 μ m. $P > 0,05$.

3. Western blotting

Os ensaios de *Western blotting* detectaram duas bandas imunorreativas para VDR em todos os lobos prostáticos, sendo uma banda principal de 55 kDa e outra de 50 kDa, como previamente descrito na próstata humana e de rato (Leman et al. 2003a; 2003b), confirmando assim, a especificidade dos anticorpos utilizados na detecção de VDR.

A análise densitométrica da intensidade de imunomarcção das bandas reativas para VDR revelou diferenças na expressão do receptor com o envelhecimento. Neste sentido, considerando todo o complexo prostático, foi observado um aumento gradativo dos níveis proteicos de VDR dos 3 aos 12 meses de idade, permanecendo similar desde então, exceto para a próstata anterior, onde o aumento ocorreu gradativamente dos 3 aos 18 meses de idade (Figura 18A – D). Além disso, foi observado diferença nos níveis de expressão de VDR entre os lobos prostáticos, sendo que o lobo ventral seguido do lobo dorsal possuem maior intensidade de expressão, quando comparados com os lobos lateral e anterior (Figura 18E).

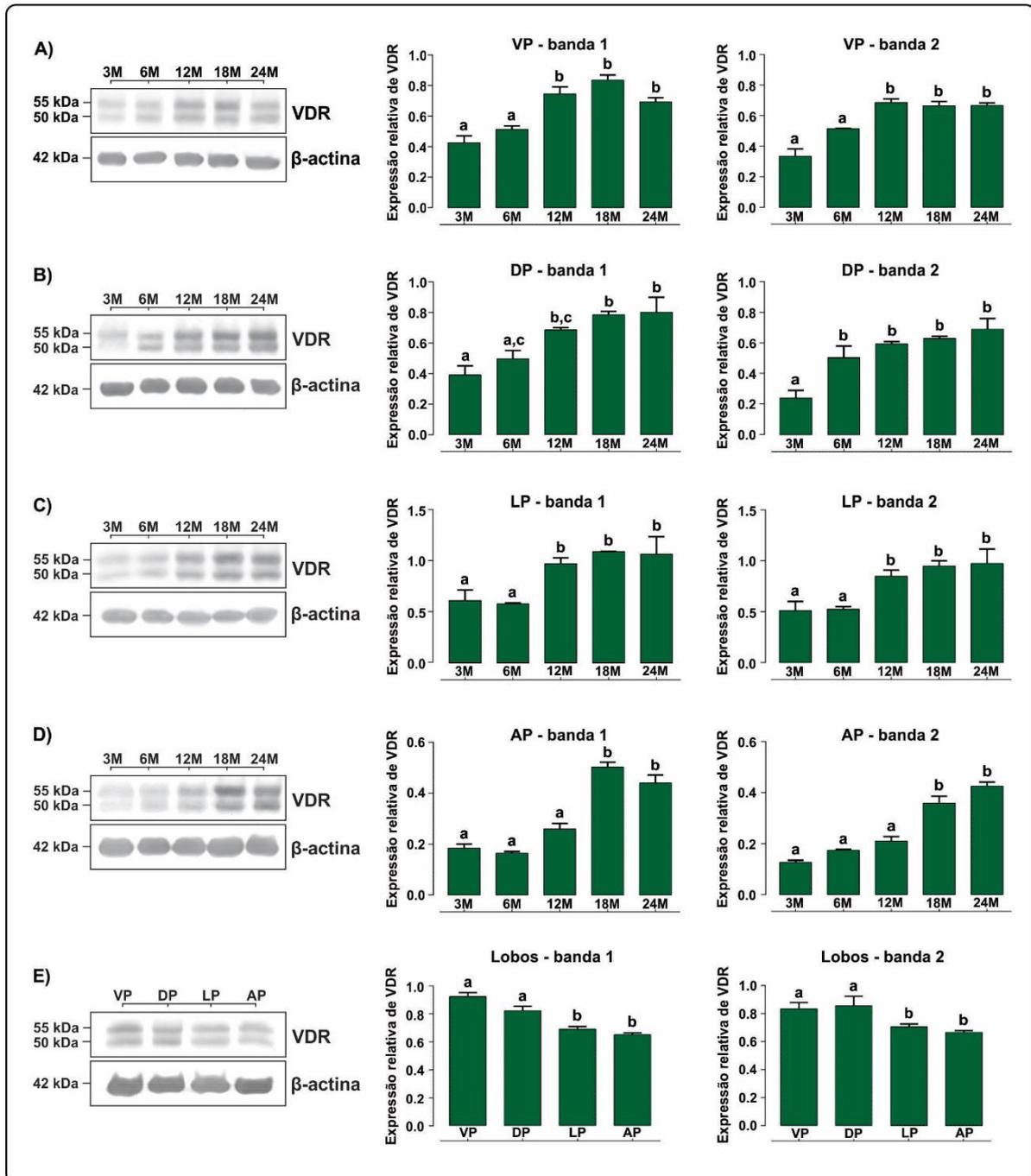


Figura 18: *Western blotting* mostrando os níveis intraprostáticos de VDR nos lobos ventral (A), dorsal (B), lateral (C) e anterior (D) de ratos de 3 aos 24 meses de idade (3M–24M), seguido da representação gráfica da análise densitométrica das bandas obtidas (55 e 50 kDa). Os valores encontrados para VDR foram normalizados com a expressão da β -actina (controle interno), sendo, portanto, apresentados como expressão relativa de VDR. (E) Comparação da expressão de VDR nos diferentes lobos prostáticos de ratos da mesma idade (12 meses). VP = próstata ventral; DP = próstata dorsal; LP = próstata lateral e AP = próstata anterior. Letras (a, b, c) indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$; $n = 5$).

4. ELISA

Os níveis plasmáticos de vitamina D em sua principal forma circulante, a 25(OH)D, apresentaram diferenças ao longo do envelhecimento. Neste sentido, nos animais de 3 e 6 meses de idade, os níveis de 25(OH)D mantiveram-se constantes e acima dos 35 e 45 ng/mL, respectivamente. Em contraste, uma marcante redução de cerca de 2,8 vezes nos níveis de 25(OH)D foi observada no plasma dos animais após os 6 meses, fato este que manteve os níveis abaixo de 20 ng/mL dos 12 até os 24 meses de idade (Figura 19). Ao contrário do evidenciado no plasma, os ensaios de ELISA não foram capazes de detectar níveis intraprostáticos de 25(OH)D em nenhum dos grupos avaliados.

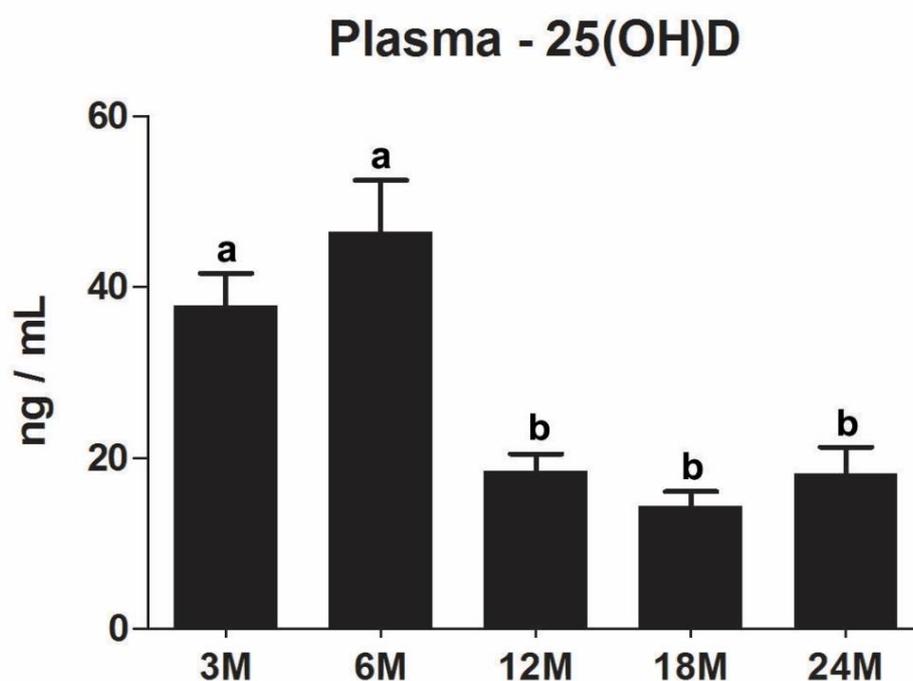


Figura 19: Níveis de 25(OH)D total no plasma de ratos Wistar em diferentes idades.* = $P \leq 0,05$ em relação aos grupos de 3 e 6 meses de idade. Letras (a, b) indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$; $n = 5$).

V. DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliou-se o padrão de expressão de VDR no complexo prostático de ratos Wistar adultos em diferentes idades (3, 6, 12, 18 e 24 meses), bem como os níveis plasmáticos e teciduais do principal metabólito circulante da vitamina D, o 25(OH)D. Os resultados revelaram que o VDR está amplamente distribuído em todos os lobos prostáticos e seus níveis aumentam significativamente com o envelhecimento, sendo este aumento inversamente proporcional às concentrações circulantes de 25(OH)D. Esses achados são inéditos, sendo que não foram encontradas referências de uma investigação sistematizada e comparativa do efeito do envelhecimento na distribuição e expressão de VDR nos diferentes lobos prostáticos de ratos como a presentemente realizada.

O peso corporal dos animais utilizados no presente estudo aumentou significativamente cerca de 1,5 vezes dos 3 aos 6 meses de idade, permanecendo estável até os 24 meses. Este resultado confirma o observado em investigações anteriores utilizando a mesma linhagem de ratos (Gonzaga, 2013; Cordeiro, 2014; Morais-Santos et al. 2015) e indica que o peso corporal se estabiliza mais tardiamente ao período em que os animais atingem a maturidade sexual, período este que ocorre por volta dos 90 dias de idade, quando a espermatogênese já está bem estabelecida e se nota predomínio de células de *Leydig* adultas nos testículos e os mais elevados níveis circulantes de testosterona (Chen et al. 2009; Wu et al. 2009; Takakura et al. 2014).

Ao contrário do observado para o peso corporal, nenhuma diferença significativa quanto ao peso relativo das próstatas ventral, dorsal, lateral e anterior com a idade foi detectada, mantendo-se regular dos 3 aos 24 meses de idade. Há um consenso na literatura de que os níveis de andrógenos, hormônios essenciais para o desenvolvimento e a manutenção da morfofisiologia da próstata, reduzem naturalmente e significativamente com o avançar da idade, tanto em homens (Krieg et al. 1993; Harman et al. 2001; Stárka et al. 2009) quanto em ratos machos (Isaacs, 1984; Banerjee et al. 1998; Wu et al. 2009; Chen et al. 2009; Morais-Santos et al. 2015). Entretanto, essa redução por si só parece não ser suficiente para alterar a massa dos lobos prostáticos de ratos sexualmente maduros, mesmo em idades mais avançadas como 18 ou 24 meses, como aqui evidenciado e em estudos anteriores (Banerjee et al. 1994; Cordeiro, 2014; Morais-Santos, 2015). Sabe-se que outros hormônios desempenham papel

importante na regulação da atividade da glândula, como os estrógenos e a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, e neste contexto, o balanço entre os níveis desses hormônios pode ser um fator importante para manter a massa do complexo prostático, uma vez que já foi constatado que tanto estrógenos quanto a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ podem atuar sinergicamente com andrógenos e influenciar o crescimento da glândula (Ehrlichman et al. 1981; Thomas & Keenan, 1994; Suzuki et al. 1994; Leman et al. 2003a; 2003b). Além disso, quando analisados juntos, independentemente da idade dos animais, a massa dos lobos prostáticos seguiu o observado pelo estudo pioneiro de Hayashi et al. (1991), sendo $\text{VP} < \text{AP} < \text{DP} = \text{LP}$.

Apesar da expressão de VDR e da ação de seu ligante na próstata ter sido inicialmente bem caracterizada em linhagens celulares de câncer de próstata, tais como LNCaP, DU-145 e PC-3 (Miller et al. 1992; Skowronski et al. 1993; Chen et al. 2000), os resultados do presente estudo corroboram investigações anteriores indicando que a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ desempenha importante papel também no tecido prostático normal (Peehl et al. 1994; Konety et al. 1996; Johnson et al. 1996; Kivineva et al. 1998; Konety et al. 2000; Leman et al. 2003a; Swami et al. 2011), uma vez que os ensaios de imunomarcagem revelaram que o VDR encontra-se amplamente distribuído no complexo prostático de ratos adultos, independentemente da idade dos animais avaliados, estando presente tanto no epitélio quanto no estroma glandular.

O padrão de distribuição celular do VDR na próstata seguiu o observado em estudos anteriores, os quais detectaram através de ensaios de sítios de ligação à $[^3\text{H}]-1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Schleicher et al. 1989; Peehl et al. 1994), *Northern blot* (Peehl et al. 1994), imunohistoquímicos (Kivineva et al. 1998; Krill et al. 2001) ou RT-qPCR (Giangreco et al. 2015), a presença de VDR nas células do epitélio e do estroma glandular, mas difere de Johnson et al. (1996) que relataram ausência do receptor nas células do estroma da próstata de ratos. Embora dados na literatura apontem maiores concentrações de VDR no compartimento epitelial (Peehl et al. 1994; Kivineva et al. 1998; Blomberg Jensen et al. 2010; Mahmoudi et al. 2012), tal receptor a nível proteico e de RNAm tem sido detectado também no estroma prostático humano (Kivineva et al. 1998; Krill et al. 2001; Blomberg Jensen et al. 2010; Giangreco et al. 2015), tanto em tecidos normais quanto naqueles acometidos por patologias. Portanto, o compartimento estromal da próstata também apresenta responsividade à $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, baseado não somente na expressão do VDR, mas também pelo fato de que fibroblastos humanos derivados de tecido prostático normal, bem como de HPB e

adenocarcinoma prostático, tiveram seu crescimento inibido em até 50% pela $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, de maneira dose-dependente (Peehl et al. 1994). Adicionalmente, um estudo recente mostrou que a expressão gênica de algumas citocinas, bem como da enzima CYP24A1 e do próprio VDR em culturas celulares derivadas do estroma da próstata humana é alterado pela administração de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Giangreco et al. 2015). Apesar das diferenças histológicas com a próstata humana, o estroma prostático de ratos também é responsivo à administração de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Konety et al. 1996; Leman et al. 2003b), e em conjunto com nossos resultados, todos esses dados corroboram com o ponto de vista de que não somente o epitélio, mas também o estroma da próstata, é altamente responsivo à forma ativa da vitamina D.

Intensa positividade para VDR foi detectada no núcleo das células epiteliais e do estroma glandular, em todo o complexo prostático de ratos Wistar. Esse padrão de localização subcelular já foi observado anteriormente em tecidos não-patológicos de próstata de roedores e humanos (Schleicher et al 1989 - camundongo; Kivineva et al. 1998 – rato e humano; Krill et al. 2001 – humano; Blomberg Jensen et al. 2010 – humano), condizendo com o papel do VDR como um potente fator de transcrição atuante na próstata. Pertencente à superfamília dos receptores nucleares, sabe-se que o receptor de vitamina D após ligação à $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ forma um heterodímero com uma das isoformas do RXR, e esse complexo ligante-VDR/RXR acopla-se em locais específicos do DNA regulando a expressão de vários genes. Na próstata, os efeitos genômicos da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ agindo via VDR têm sido relacionados com processos de indução da apoptose e parada de crescimento celular, promoção da diferenciação celular, bem como supressão da inflamação e angiogênese (Peehl et al. 1994; Chen & Holick, 2003; Hsu et al. 2001; Krishnan & Feldman 2011; Swami et al. 2011).

Mesmo após bloqueio de ligações inespecíficas, o citoplasma principalmente das células secretoras do epitélio mostrou reatividade aos anticorpos utilizados no presente estudo, apresentando coloração leve, porém perceptível. Marcações citoplasmáticas são também observadas para outros receptores de esteroides normalmente encontrados na próstata, como os receptores de estrógenos (Pasquali et al. 2001; Tirado et al. 2004; Gallardo et al. 2007; Morais-Santos et al. 2015) e andrógenos (Prins & Birch, 1993; Gallardo et al. 2007), e em contraste com nossos resultados e de estudos anteriores (Schleicher et al 1989; Kivineva et al. 1998; Krill et al. 2001), intensa imunoreatividade para VDR no citoplasma ao invés do núcleo já foi observada por imunohistoquímica na próstata de roedores (Johnson et

al. 1996 – rato; Mahmoudi et al. 2012 – camundongo), bem como no tecido maligno de homens diagnosticados com câncer de próstata (Hendrickson et al. 2011). Embora sabe-se que uma fração do VDR possa ser encontrada no citoplasma e até mesmo na membrana plasmática, locais onde o receptor de vitamina D exerce funções não-genômicas (Huhtakangas et al. 2004; Gonzalez Pardo et al. 2008; Haussler et al. 2011), essa localização preferencialmente citoplasmática na próstata sob condições normais não condiz com o observado na literatura, podendo ser resultante da divergência do padrão de imunomarcção de anticorpos primários anti-VDR, como já demonstrado anteriormente por imunohistoquímica e *Western blotting* utilizando anticorpos comerciais e não-comerciais (Wang et al. 2010; Wang & DeLuca 2011). Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade de que a intensa marcação do VDR no citoplasma, evidenciada por Hendrickson et al. (2011), possa estar associada com a malignidade no tecido prostático, visto que esse padrão de localização do VDR já foi descrito em vários tipos de cânceres (Liu et al. 2006 – rim; Khadzkou et al. 2006 – tireoide; Seubwai et al. 2007 – colangiocarcinoma; Kure et al. 2009 – colorretal; Silvagno et al. 2010b – ovário).

Um dado intrigante foi que muitas das células com localização e morfologia sugestivas de células basais apresentaram positividade nuclear mais intensa para o VDR, quando comparado com as células luminais adjacentes no epitélio glandular. Esse resultado se repetiu em todos os lobos prostáticos, independentemente da idade dos animais. De fato, o primeiro trabalho a identificar sítios de ligação específicos para a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na próstata encontrou maior atividade ligadora no núcleo das células basais do epitélio prostático, apontando a presença de receptores específicos para tal hormônio nesse tipo celular (Schleicher et al. 1989). Apesar disso, os estudos posteriores que realizaram imunodeteção do VDR nas células epiteliais humanas do tecido normal ou acometido por HPB ou câncer (Peehl et al. 1994; Kivineva et al. 1998; Krill et al. 2001; Hendrickson et al. 2011; Giangreco et al. 2015), bem como no epitélio prostático de roedores (Johnson et al. 1996 – rato; Kivineva et al. 1998 – rato; Mahmoudi et al. 2012 – camundongo), descreveram positividade apenas nas células secretoras do epitélio ou não fizeram distinção entre células basais e células secretoras. Uma exceção foi o trabalho de Blomberg Jensen et al. (2010) que identificou por imunohistoquímica, positividade para VDR tanto nas células basais quanto nas células luminais da próstata humana, contudo, sem comparar a intensidade de imunomarcção nesses dois tipos celulares. Portanto, nosso resultado é inédito e destaca a necessidade de se

diferenciar os tipos celulares presentes no epitélio prostático, os quais podem apresentar diferenças quanto à sensibilidade de reposta não só à $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, mas também a outros hormônios atuantes na glândula.

Reforçando esse ponto de vista, há informação de que semelhante ao observado para VDR, a expressão da principal isoforma do receptor retinoide X atuante na próstata, o $\text{RXR}\alpha$, é mais proeminente no núcleo das células basais quando comparado com as células secretoras (Mao et al. 2004). Redução significativa de células basais positivas para $\text{RXR}\alpha$ foi observada em lesões pré-malignas (PIN) quando comparado com adenômeros com morfologia normal. Além disso, redução gradual da expressão do $\text{RXR}\alpha$ nas células basais foi detectada quando adenômeros da próstata humana sadia e aqueles adjacentes ao adenocarcinoma prostático foram comparados (Mao et al. 2004). Esses dados sustentam a hipótese de que as células basais são importantes protagonistas em mediar os efeitos protetores da vitamina D no epitélio, e acrescentam evidências de que a perda da sinalização do complexo VDR/ $\text{RXR}\alpha$ nas células basais pode ser um fator importante para a carcinogênese na glândula, ainda mais pela ausência dessas células no adenocarcinoma prostático.

No epitélio da próstata, já está bem estabelecido que a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ agindo via VDR exerce efeitos anti-proliferativo e pró-diferenciação, tanto no epitélio normal quanto no acometido por desordens proliferativas, de maneira dose-dependente (Miller et al. 1992; Skowronski et al. 1993; Peehl et al. 1994; Konety et al. 1996; Hsu et al. 2001; Leman et al. 2003b; Moreno et al. 2005). Ainda, a marcante presença do VDR no epitélio glandular sustenta a participação desse receptor na regulação da atividade secretora prostática, como sugerido também para o epitélio da vesícula seminal e epidídimo (Johnson et al. 1996). Por outro lado, não foram encontradas informações que vinculem a responsividade das células basais às funções desempenhadas pela $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ e de seu receptor no epitélio prostático. Apesar das células basais serem conhecidas como células-tronco teciduais, evidências têm sugerido que esse tipo celular é capaz de estabelecer comunicação com outras células epiteliais e modular a função epitelial no sistema genital masculino (El-Alfy et al. 2000; Shum et al. 2008; Kim et al. 2015). Além disso, sabe-se que algumas células basais da próstata podem expressar numerosas enzimas esteroidogênicas (El-Alfy et al. 2000; Pelletier et al. 2001; Takase et al. 2006), assim como todo o conjunto de enzimas participantes do metabolismo da vitamina D (Blomberg Jensen et al. 2010) e o RXR , receptor que forma

heterodímero com o VDR (Mao et al. 2004). Desse modo, a marcante presença do VDR nas células basais evidenciada no presente trabalho, somada aos resultados previamente descritos por Schleicher et al. (1989) e Mao et al. (2004), destacam o envolvimento das células basais nos efeitos da sinalização da vitamina D no epitélio prostático.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa, avaliando a histopatologia do complexo prostático de ratos Wistar de 3 – 24 meses de idade, detectou alterações morfológicas espontâneas no epitélio de todos os lobos prostáticos a partir dos 12 meses, as quais se intensificaram nos grupos de 18 e 24 meses idade (Morais-Santos et al. 2015). Dentre essas alterações destacam-se áreas de pregueamento epitelial sugestivo de hiperplasias, atrofia do epitélio (mais restrito à VP) e focos proliferativos característicos de neoplasias intraepiteliais prostática (PIN), sendo que nessas duas últimas alterações, detectou-se redução da expressão do receptor de estrógenos ER β (Morais-Santos et al. 2015). Sabe-se que assim como o VDR, o receptor de estrógenos ER β é intensamente expresso no epitélio prostático e exerce funções pró-apoptótica, anti-proliferativa e pró-diferenciação, desempenhando, portanto, um efeito protetor contra o câncer. Tal fato somado a ocorrência das mesmas alterações morfológicas ligadas ao envelhecimento nos animais do presente estudo, nos motivou investigar possíveis variações locais na expressão do VDR em áreas de alteração epitelial.

Diferindo do observado para ER β (Morais-Santos et al. 2015), a intensidade de imunomarcção para VDR nas áreas de PIN em todos os lobos prostáticos foi similar ao observado para o epitélio normal, mesmo observando padrão de marcação heterogêneo nessas áreas. O mesmo foi detectado no epitélio atrófico da VP e em áreas sugestivas de hiperplasia nos diferentes lobos prostáticos, onde não se observou variações na intensidade de marcação quando comparado ao epitélio normal adjacente. Este é o primeiro estudo em modelo animal a avaliar comparativamente a expressão do receptor de vitamina D entre as áreas de alteração epitelial e o epitélio normal, sendo que nossos resultados indicam responsividade dessas áreas alteradas à $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, inclusive nas áreas de PIN, as quais são reconhecidas como lesões pré-malignas (Woenckhaus & Fenic, 2008). No entanto, a presença de um maior número de células negativas para VDR na PIN em relação ao epitélio normal adjacente pode reduzir a magnitude das ações desempenhadas pela $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ via seu receptor específico nessas áreas de alteração epitelial.

Interessantemente, Banach-Petrosky et al (2006) utilizando camundongos mutantes para *Nkx3.1;Pten*, os quais recapitulam estágios da carcinogênese prostática, desde PIN até adenocarcinoma, demonstraram que a administração de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reduziu significativamente tanto a formação quanto a progressão de PIN, e os efeitos inibitórios ocorreram concomitantes com os altos níveis do VDR no local e foram mais eficazes quando a administração da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ antecedeu o surgimento das lesões pré-malignas. Esses dados, juntamente com os altos níveis de VDR encontrados tanto no extrato tecidual total quanto no epitélio prostático normal ou alterado de ratos senis, sustentam a possibilidade de utilização da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ou de seus análogos na prevenção de patologias prostáticas ligadas ao envelhecimento, como o câncer de próstata, principalmente em momentos precoces ao desenvolvimento dessas patologias.

A especificidade dos anticorpos utilizados nos ensaios imunohistoquímicos, bem como a presença do VDR nas próstatas ventral, dorsal, lateral e anterior de ratos Wistar sexualmente maduros, foram confirmadas por *Western blotting*, através da detecção de duas bandas bem definidas e imunorreativas para o anticorpo monoclonal anti-VDR (clone 9A7 γ), cujo peso molecular (55 kDa e 50 kDa) corresponde ao descrito anteriormente para a próstata humana e de ratos (Leman et al. 2003a; 2003b). A presença de duas bandas próximas, porém espaçadas e imunorreativas para VDR, tem sido frequentemente observada na literatura, principalmente nos *immunoblots* utilizando o clone 9A7 γ (Masuyama & MacDonald, 1998; Jensen et al. 2002; Narvaez et al. 2003; Gonzalez Pardo et al. 2008). Por outro lado, é importante ressaltar que a ocorrência de apenas uma banda imunorreativa para o VDR já foi relatada por outros autores, através da utilização do clone 9A7 γ (Midorikawa et al. 1999; Zinser et al. 2003) ou de outros (Silvagno et al. 2010a; Wang et al. 2010). De fato, não há um consenso sobre o motivo de se detectar mais de uma banda correspondente ao VDR nos ensaios de *Western blotting*. Evidências indicam que a banda mais pesada, aqui identificada como 55 kDa, é a principal correspondente ao VDR intacto, ou seja, o produto da tradução do receptor de 427 aminoácidos, e que a presença de outra banda imunorreativa próxima e de menor peso molecular, possa resultar do processo de fosforilação proteica (Jurutka et al. 1993; Narvaez et al. 2003) ou ainda representar uma subpopulação do receptor conhecida como VDR truncado, a qual apresenta uma cadeia polipeptídica mais curta e é alvo da atividade proteolítica celular (Masuyama & MacDonald, 1998; Wang et al. 2010).

A análise densitométrica das bandas detectadas pelo *Western blotting* revelou um marcante aumento dos níveis de VDR a partir dos 12 meses de idade. Esse dado é importante, sendo que o aumento significativo dos níveis proteicos de VDR nas idades mais avançadas, quando comparado com 3 e 6 meses, foi observado em todos os lobos prostáticos. Corroborando os resultados do *Western blotting*, variação similar foi observada ao longo do envelhecimento nos ensaios imunohistoquímicos, os quais detectaram um aumento da intensidade de marcação do receptor no núcleo das células do epitélio normal das próstatas ventral e dorsal de animais de 12 – 24 meses de idade. Apesar de significativa, vale ressaltar que tal variação nos níveis de VDR detectada por imunohistoquímica foi menos proeminente do que o observado por *Western blotting*, e possivelmente retrata diferenças quanto a sensibilidade e/ou amostragem entre as duas técnicas.

Alterações nos níveis de VDR tem sido correlacionado com a faixa etária, mas em contraste com nossos resultados, reduzida expressão desse receptor em idades mais avançadas já foi observada nas células ósseas e no intestino de ratos e humanos (Horst et al 1990; Ebeling et al. 1992; Gonzalez Pardo et al. 2008). Na próstata, apenas um estudo comparou o efeito do envelhecimento sobre os níveis teciduais de VDR, o qual, através da avaliação por imunohistoquímica de tecidos prostáticos humano de doadores de órgãos de idades variadas (10 – 70 anos), constatou que os níveis do VDR aumentaram a partir da primeira década de vida e atingiram o pico na quinta década, reduzindo a partir de então (Krill et al. 2001). No referido trabalho, Krill e colaboradores consideraram apenas tecidos livres de adenocarcinoma ou lesões suspeitas, e a avaliação dos níveis do VDR foi realizada através da criação de uma escala de 1 a 3 baseada na intensidade e no número de núcleos positivos para VDR no epitélio glandular. Os mais baixos níveis do receptor de vitamina D no epitélio glandular nos indivíduos mais jovens (10 – 19 anos), bem como o aumento até a quinta década de vida, corrobora o observado no presente estudo, onde detectou-se um aumento gradativo das concentrações do VDR na próstata de ratos Wistar dos 3 aos 12 meses. Entretanto, a redução dos níveis de tal receptor no epitélio prostático de homens em idades mais avançadas (a partir dos 50 anos) (Krill et al. 2001) difere dos nossos resultados, visto que os altos níveis de VDR foram detectados tanto por *Western blotting* quanto por imunohistoquímica mesmo na próstata dos animais senis (18 e 24 meses). De fato, o trabalho de Krill et al. (2001) foi um dos principais a demonstrar *in vivo* a existência de variações idade-dependentes nos níveis teciduais do VDR. Entretanto, algumas observações importantes

sobre o referido trabalho podem justificar a divergência observada por nós quanto aos níveis do receptor de vitamina D na próstata senil.

A primeira observação é quanto à obtenção dos tecidos e o N amostral. No estudo de Krill et al. (2001), os autores trabalharam com 27 amostras de próstata humana obtidas em um banco de tecidos. Tais amostras foram distribuídas em 6 grupos de acordo com a faixa etária dos doadores de órgãos, sendo a idade e a quantidade por grupo: 10 – 19 anos (n = 4); 20 – 29 (n = 6); 30 – 39 (n = 3); 40 – 49 (n = 4); 50 – 59 (n = 6); 60 – 69 (n = 4). O N amostral por grupo variando de 3 – 6 indivíduos, justifica-se pela dificuldade em obter amostras não-patológicas de tecido humano. Entretanto, vale a pena salientar que esse N amostral para investigação em tecido humano é considerado baixo, ainda mais havendo evidências de uma forte variação na expressão de VDR entre amostras humanas de tecido prostático normal (Kivineva et al. 1998). Além disso, sabe-se que o acondicionamento e o processamento do tecido-alvo são pontos cruciais a serem considerados, sendo que o tempo entre a constatação do óbito do indivíduo doador e a liberação legal para retirada dos órgãos e posterior armazenamento/fixação dos mesmos, pode influenciar nos resultados dos ensaios imunohistoquímicos.

Segundo, não foi relatado as condições de saúde dos doadores antes do óbito, e apesar dos autores terem descrito redução nos níveis do VDR a partir dos 50 anos baseado nos ensaios imunohistoquímicos, apenas imagens da zona central da próstata de indivíduos de 10 e 20 anos de idade foram apresentadas, inviabilizando a comparação com nossas imagens imunohistoquímicas mostrando o padrão de marcação do VDR na próstata dos animais senis. Ainda, a análise dos níveis de VDR empregada no estudo de Krill et al. (2001) baseou-se na estimativa de um escore na escala de 1 – 3 para cada secção histológica avaliada, o qual configura-se como uma análise subjetiva que pode variar de acordo com o investigador, sendo, portanto, menos sensível que a análise quantitativa da intensidade de imunomarcação apresentada no presente trabalho.

Terceiro, positividade para VDR foi encontrada no núcleo das células do epitélio e do estroma glandular humano (Krill et al. 2001), semelhante ao observado por nós na próstata de ratos. Entretanto, existe marcante diferença quanto à histologia do estroma entre essas espécies, sendo que o compartimento estromal da próstata humana é muito abundante e possui delgadas camadas de células musculares lisas e numerosos fibroblastos. Frente a isso, a

contribuição do estroma da próstata humana para os níveis proteicos teciduais não pode ser ignorada, sendo que técnicas como o *Western blotting* que utilizam extrato total de tecido, se tornam mais confiáveis para a estimativa das concentrações do VDR na próstata ao longo do envelhecimento.

Por fim, não podemos descartar a possibilidade de alterações nos níveis proteicos do VDR na próstata de ratos a partir dos 24 meses, baseando-se na constatação da reduzida imunomarcagem para tal receptor a partir de idades mais avançadas (Krill et al. 2001). Contudo, é importante ressaltar a dificuldade em obter ratos Wistar com idade superior a 24 meses, mesmo não medindo esforços para tal, em função da alta mortalidade dos animais com o avançar da idade.

Os mais baixos níveis de VDR em todo o complexo prostático de ratos de 3 e 6 meses pode estar relacionado com o efeito anti-proliferativo que esse receptor ativado desempenha na glândula, uma vez que esses mesmos grupos apresentam os maiores índices de proliferação celular no epitélio prostático, quando comparado com os animais de 12, 18 e 24 meses de idade (Cordeiro, 2014; Morais-Santos et al. 2015). No entanto, o aumento das concentrações teciduais do VDR a partir dos 12 meses ocorreu paralelo à marcante redução de cerca de 2,8 vezes nos níveis plasmáticos de 25(OH)D. Nesse sentido, uma possível redução dos níveis intraprostáticos de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ devido à baixa concentração de seu precursor poderia explicar o aumento da expressão do VDR com o envelhecimento, uma vez que observa-se menor expressão desse receptor no tecido prostático contendo elevadas concentrações de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, sendo que os ensaios em culturas primárias de células, derivadas tanto do epitélio quanto do estroma prostático, confirmaram a regulação negativa que a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ exerce sobre a expressão do VDR (Giangreco et al. 2015). Adicionalmente, a avaliação do padrão de expressão na próstata ao longo do envelhecimento da enzima CYP24A1, reguladora dos níveis teciduais da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, bem como do RXR, receptor que forma heterodímero com VDR, pode ser um fator importante para explicar as variações nos níveis do receptor de vitamina D observadas no presente trabalho.

Variação idade-dependente nas concentrações da 25(OH)D sanguínea já está bem estabelecida em humanos, onde observa-se que a deficiência de vitamina D, condição clínica caracterizada por níveis séricos ou plasmáticos de 25(OH)D abaixo de 20 ng/mL, é muito comum em pessoas idosas e está associada tanto ao hábito de vida quanto a uma redução de

mais da metade da capacidade da pele senil em produzir vitamina D₃ (MacLaughlin & Holick, 1985; Holick, 2008). No entanto, é importante ressaltar que os animais avaliados no presente estudo em nenhum momento foram expostos à radiação UVB, recebendo o único aporte de vitamina D₃ através da ração comercial padrão para ratos administrada *ad libitum*. Tal fato indica que os baixos níveis de 25(OH)D, comumente observados em idades mais avançadas, podem estar associados também a outros fatores que vão além do tempo de exposição à luz solar ou da capacidade da pele em sintetizar vitamina D₃, como por exemplo, uma redução da absorção intestinal de tal vitamina com a idade, ou ainda redução da expressão/atividade das enzimas 25-hidroxilases presentes principalmente no fígado. Se confirmada essa hipótese, os benefícios da utilização do colecalciferol (vitamina D₃) ao invés de seus metabólitos como agente preventivo ou terapêutico, pode ser limitado em pessoas idosas.

Muitos estudos corroboram a associação inversa entre os níveis circulantes de 25(OH)D e o risco em desenvolver câncer de próstata (Schwartz & Hulka, 1990; John et al. 2005; Krishnan & Feldman, 2011; Swami et al. 2011; Trump et al. 2010; van der Rhee et al. 2012), e neste contexto, a deficiência de vitamina D pode resultar em baixos níveis de 1 α ,25(OH)₂D e limitar os efeitos protetores anti-câncer que esse hormônio desempenha na próstata (Miller et al. 1992; Skowronski et al. 1993; Peehl et al. 1994; Hsu et al. 2001; Chen et al. 2002; Chen & Holick, 2003; Moreno et al. 2005; Krishnan & Feldman 2011). Entretanto, nossos resultados mostram claramente que a magnitude de resposta à vitamina D na próstata não se deve basear apenas nos níveis de 25(OH)D e de seu respectivo metabólito, mas principalmente nas concentrações do VDR nas células-alvo, as quais podem ser inversamente proporcionais aos níveis de 25(OH)D sanguíneo. Sustentando esse ponto de vista, Hendrickson et al. (2011) examinaram a expressão do VDR por imunohistoquímica em 841 pacientes diagnosticados com câncer de próstata e encontraram significativa associação entre as altas concentrações do VDR no tecido maligno e o reduzido risco de desenvolvimento de tumores em estágio avançado ou até mesmo letal, independentemente dos níveis plasmáticos de 25(OH)D.

Além da idade, diferenças quanto à expressão do receptor de vitamina D entre os lobos prostáticos dos ratos Wistar foram observadas, onde VP > DP > LP = AP. Variação região-específica semelhante a observada aqui também ocorre em humanos, onde a expressão do VDR na zona periférica, região equivalente aos lobos dorsolaterais, é cerca de 35% mais

proeminente do que na zona central, a qual equivale a próstata anterior de ratos (Krill et al. 2001). Esse é mais um resultado que evidencia a semelhança da sinalização da vitamina D entre o nosso modelo animal e humanos, e atribui importância ao estudo comparativo entre as regiões da glândula, as quais podem apresentar resposta à $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ de magnitudes diferentes.

Sabe-se que um dos principais efeitos da sinalização da vitamina D na próstata é a inibição da proliferação celular, seja pela atuação no bloqueio da transição entre as fases G_1/S do ciclo celular ou pela atenuação de fatores estimulantes do crescimento celular (Miller et al. 1992; Skowronski et al. 1993; Peehl et al. 1994; Yang & Burnstein, 2003; Moreno et al. 2005; Swami et al. 2011). Os mais elevados níveis de VDR na VP em relação aos outros lobos prostáticos está em concordância com a menor proporção de células negativas encontrada nesse lobo e corrobora o efeito anti-proliferativo desse receptor na próstata, visto que este é o lobo menos acometido por distúrbios proliferativos (Hayashi et al. 1991; Banerjee et al. 1998; Suzuki et al. 2007). Adicionalmente, a presença de algumas células pouco reativas ou até mesmo negativas para VDR observadas no epitélio normal e principalmente em áreas de PIN, pode estar relacionada a esse efeito. Padrão similar para $\text{ER}\beta$, o qual medeia um efeito anti-proliferativo assim como o VDR, foi recentemente detectado na próstata de ratos Wistar (Morais-Santos et al. 2015). Ensaios de microscopia confocal confirmaram a atividade proliferativa dessas células menos coradas ou negativas para $\text{ER}\beta$, as quais apresentaram positividade para o marcador de proliferação celular Ki67 (Morais-Santos et al. 2015). Por outro lado, não podemos descartar a possibilidade de algumas das células epiteliais negativas para VDR pertencerem ao pequeno grupo de células neuroendócrinas, as quais também se mostram negativas para receptores de outros hormônios esteroides atuantes na próstata, como os andrógenos (Krijnen et al. 1993; Sun et al. 2009). Caso confirmado, os efeitos anti-câncer desempenhados pela $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ agindo via VDR não poderão prevenir ou retardar o desenvolvimento de carcinomas neuroendócrinos.

VI. CONCLUSÃO

VI. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo corroboram a hipótese de que a vitamina D é um importante hormônio atuante na próstata, baseado na ampla distribuição do receptor de vitamina D em todo o complexo prostático e no fato de que altos níveis de VDR foram detectados tanto no extrato tecidual total quanto no epitélio prostático normal ou alterado de ratos senis. Adicionalmente, o presente trabalho, em conjunto com dados relevantes da literatura, confirma a existência de variação idade-dependente no sistema endócrino vitamina D e traz evidências consistentes de que, para se interpretar a magnitude da sinalização da vitamina D, não se deve focar somente na concentração de 25(OH)D e de seu respectivo metabólito, mas também nos níveis de VDR nas diferentes células-alvo, uma vez que se detectou um aumento significativo da expressão do VDR na próstata a partir dos 12 meses, paralelo à marcante redução dos níveis plasmáticos de 25(OH)D. Além disso, a maior intensidade de imunomarcção para VDR nas células basais indica que essas células podem ser importantes protagonistas em mediar os efeitos protetores da vitamina D no epitélio, e destaca a necessidade de se diferenciar os tipos celulares presentes no epitélio prostático, os quais podem apresentar diferenças quanto a sensibilidade de resposta não só à $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, mas também a outros hormônios atuantes na glândula. Por fim, nossos resultados indicam um possível envolvimento entre o desbalanço local na via do receptor de vitamina D e a carcinogênese prostática, uma vez que o maior número de células negativas para VDR foi detectado nas áreas de PIN, as quais são consideradas lesões pré-malignas.

VII. PERSPECTIVAS

VII. PERSPECTIVAS

Considerando que houve um aumento significativo da expressão do VDR na próstata a partir dos 12 meses de idade, o qual foi responsável por manter altas concentrações desse receptor mesmo em idades mais avançadas (24 meses), a investigação dos níveis intraprostáticos da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ ao longo do envelhecimento, bem como da enzima CYP24A1 que controla as concentrações teciduais desse hormônio, podem ser fatores importantes para explicar a variação idade-dependente na expressão do VDR observada no presente trabalho, uma vez que a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ pode atuar regulando a expressão de seu próprio receptor (Giangreco et al. 2015). Adicionalmente, torna-se interessante investigar o padrão de expressão do RXR na próstata dos animais aqui avaliados, visto que essa proteína é essencial para que o VDR ativado exerça seus efeitos genômicos nas células-alvo, além de tal investigação nunca ter sido realizada na próstata ao longo do envelhecimento. Ainda, a análise da expressão gênica do VDR e da integridade de sua estrutura proteica poderia fornecer dados complementares e inéditos sobre o comportamento e a eficiência de ligação desse receptor em relação ao envelhecimento.

Interessantemente, muitas das células com localização e morfologia sugestivas de células basais apresentaram imunomarcagem nuclear mais intensa quando comparado com as células luminais adjacentes, enquanto que outras, porém em menor número, se coraram normalmente ou até mesmo mostraram-se negativas para VDR, semelhante ao observado para as células luminais. Portanto, a confirmação da identidade dessas células que se coram mais intensamente através de ensaios de co-localização para VDR e marcadores específicos para células basais, tais como p63, citoqueratinas 5 e 14 e Bcl2, é fundamental para confirmar a identidade desse tipo celular e sua participação em mediar as ações da sinalização da vitamina D no epitélio prostático, as quais são associadas apenas às células luminais. Além disso, a caracterização das células não-reativas para VDR presentes em áreas de epitélio normal e principalmente na PIN, semelhante ao observado recentemente para ER β (Morais-Santos et al. 2015), poderá esclarecer a atividade proliferativa dessas células e corroborar o possível papel anti-proliferativo mediado pelo VDR ativado. Contudo, não se pode descartar a possibilidade de que algumas das células negativas para VDR representem a pequena

população de células neuroendócrinas presentes no epitélio prostático, as quais apresentam-se negativas também para o receptor de andrógenos (Krijnen et al. 1993; Sun et al. 2009). Desse modo, a co-localização para VDR e marcadores específicos de células neuroendócrinas, como a cromogranina A ou a sinaptofisina, é importante para verificar a ausência de VDR nesse tipo celular, fato este que poderá indicar limitações na utilização de agonistas para VDR como agente preventivo ou terapêutico contra carcinomas prostáticos de origem neuroendócrina.

Em contraste com o observado para VDR, uma marcante redução de cerca de 2,8 vezes nos níveis de 25(OH)D foi observada no plasma dos animais a partir dos 12 meses de idade. A redução dos níveis circulantes de 25(OH)D é uma condição muito comum em pessoas idosas e tem sido associada tanto ao hábito de vida quanto a uma redução de mais da metade da capacidade da pele senil em produzir vitamina D₃ (MacLaughlin & Holick, 1985; Holick, 2008). Entretanto, nossos resultados apontam o envolvimento de outros fatores responsáveis pelas baixas concentrações sanguíneas de 25(OH)D comum em idades mais avançadas, os quais vão além do tempo de exposição à luz solar ou da capacidade da pele em sintetizar vitamina D₃, uma vez que os animais avaliados no presente estudo em nenhum momento foram expostos à radiação UVB, recebendo o único aporte de vitamina D₃ através da ração comercial padrão para ratos. Nesse sentido, é interessante investigar a influência do envelhecimento na absorção intestinal da vitamina D ou na expressão/atividade das enzimas 25-hidroxilases presentes principalmente no fígado.

Por fim, embora não tenha sido encontrado variação quanto a intensidade de imunomarcagem das células positivas para VDR nas áreas alteradas, observadas na próstata senil em relação ao epitélio normal adjacente, dados relevantes na literatura indicam que alterações tanto na expressão quanto na atividade principalmente das enzimas CYP27B1 e CYP24A1, as quais são responsáveis pela produção e inativação da 1 α ,25(OH)₂D, respectivamente, podem limitar ações benéficas deste hormônio na próstata acometida por patologias (Hsu et al. 2001; Luo et al. 2010; Swami et al. 2011). Portanto, a investigação do padrão de expressão das enzimas participantes do metabolismo local da vitamina D poderia trazer informações importantes sobre a sinalização de tal vitamina no tecido prostático senil, além de fornecer dados inéditos sobre os níveis prostáticos dessas enzimas ao longo do envelhecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamsson, P. A. (1999). Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocr Relat Cancer*, 6(4), 503-519.
- Aumüller, G. (1979). *Prostate Gland and Seminal Vesicles*. II ed. Berlin: Springer.
- Aumuller, G. (1989). Morphologic and regulatory aspects of prostatic function. *Anat Embryol (Berl)*, 179(6), 519-531.
- Banach-Petrosky, W., Ouyang, X., Gao, H., Nader, K., Ji, Y., Suh, N., et al. (2006). Vitamin D inhibits the formation of prostatic intraepithelial neoplasia in Nkx3.1;Pten mutant mice. *Clin Cancer Res*, 12(19), 5895-5901.
- Banerjee, P. P., Banerjee, S., Dorsey, R., Zirkin, B. R., & Brown, T. R. (1994). Age- and lobe-specific responses of the brown Norway rat prostate to androgen. *Biol Reprod*, 51(4), 675-684.
- Banerjee, P. P., Banerjee, S., Lai, J. M., Strandberg, J. D., Zirkin, B. R., & Brown, T. R. (1998). Age-dependent and lobe-specific spontaneous hyperplasia in the brown Norway rat prostate. *Biol Reprod*, 59(5), 1163-1170.
- Begley, L. A., Kasina, S., MacDonald, J., & Macoska, J. A. (2008). The inflammatory microenvironment of the aging prostate facilitates cellular proliferation and hypertrophy. *Cytokine*, 43(2), 194-199.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(7), 517-529.
- Bikle, D. D. (2009). Extra Renal Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D and its Health Implications. *Clinic Rev Bone Miner Metab*, 7, 114-125
- Bikle, D. D. (2014). Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol*, 21(3), 319-329.
- Blomberg Jensen, M. (2014). Vitamin D and male reproduction. *Nat Rev Endocrinol*, 10(3), 175-186.
- Blomberg Jensen, M., Jorgensen, A., Nielsen, J. E., Bjerrum, P. J., Skalkam, M., Petersen, J. H., et al. (2012). Expression of the vitamin D metabolizing enzyme CYP24A1 at the annulus of human spermatozoa may serve as a novel marker of semen quality. *Int J Androl*, 35(4), 499-510.

- Blomberg Jensen, M., Nielsen, J. E., Jorgensen, A., Rajpert-De Meyts, E., Kristensen, D. M., Jorgensen, N., et al. (2010). Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. *Hum Reprod*, 25(5), 1303-1311.
- Bourlon, P. M., Faure-Dussert, A., & Billaudel, B. (1997). Modulatory role of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on pancreatic islet insulin release via the cyclic AMP pathway in the rat. *Br J Pharmacol*, 121(4), 751-758.
- Chen, H., Ge, R. S., & Zirkin, B. R. (2009). Leydig cells: From stem cells to aging. *Mol Cell Endocrinol*, 306(1-2), 9-16.
- Chen, T. C., & Holick, M. F. (2003). Vitamin D and prostate cancer prevention and treatment. *Trends Endocrinol Metab*, 14(9), 423-430.
- Chen, T. C., Schwartz, G. G., Burnstein, K. L., Lokeshwar, B. L., & Holick, M. F. (2000). The in vitro evaluation of 25-hydroxyvitamin D3 and 19-nor-1alpha,25-dihydroxyvitamin D2 as therapeutic agents for prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 6(3), 901-908.
- Cordeiro, J.D.M. (2014). Avaliação do perfil de proliferação celular na próstata dorsal de ratos Wistar em envelhecimento. Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Danielpour, D., Kadomatsu, K., Anzano, M. A., Smith, J. M., & Sporn, M. B. (1994). Development and characterization of nontumorigenic and tumorigenic epithelial cell lines from rat dorsal-lateral prostate. *Cancer Res*, 54(13), 3413-3421.
- Dornas, R. A., Oliveira, A. G., Kalapothakis, E., Hess, R. A., Mahecha, G. A., & Oliveira, C. A. (2007). Distribution of vitamin D3 receptor in the epididymal region of roosters (*Gallus domesticus*) is cell and segment specific. *Gen Comp Endocrinol*, 150(3), 414-418.
- Ebeling, P. R., Sandgren, M. E., DiMagno, E. P., Lane, A. W., DeLuca, H. F., Riggs, B.L. (1992). Evidence of an age-related decrease in intestinal responsiveness to vitamin D: relationship between serum 1,25-dihydroxyvitamin D3 and intestinal vitamin D receptor concentrations in normal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 75, 176-182.
- El-Alfy, M., Pelletier, G., Hermo, L. S., & Labrie, F. (2000). Unique features of the basal cells of human prostate epithelium. *Microsc Res Tech*, 51(5), 436-446.
- Fleet, J. C., Eksir, F., Hance, K. W., & Wood, R. J. (2002). Vitamin D-inducible calcium transport and gene expression in three Caco-2 cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283(3), G618-625.
- Gallardo, F., Mogas, T., Baro, T., Rabanal, R., Morote, J., Abal, M., et al. (2007). Expression of androgen, oestrogen alpha and beta, and progesterone receptors in the canine prostate: differences between normal, inflamed, hyperplastic and neoplastic glands. *J Comp Pathol*, 136(1), 1-8.

- Gao, X. H., Dwivedi, P. P., Choe, S., Alba, F., Morris, H. A., Omdahl, J. L., et al. (2002). Basal and parathyroid hormone induced expression of the human 25-hydroxyvitamin D 1alpha-hydroxylase gene promoter in kidney AOK-B50 cells: role of Sp1, Ets and CCAAT box protein binding sites. *Int J Biochem Cell Biol*, 34(8), 921-930.
- Giangreco, A. A., Dambal, S., Wagner, D., Van der Kwast, T., Vieth, R., Prins, G. S., et al. (2015). Differential expression and regulation of vitamin D hydroxylases and inflammatory genes in prostate stroma and epithelium by 1,25-dihydroxyvitamin D in men with prostate cancer and an in vitro model. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 148, 156-165.
- Goncalves, B. F., de Campos, S. G., Zanetoni, C., Scarano, W. R., Falleiros, L. R., Jr., Amorim, R. L., et al. (2013). A new proposed rodent model of chemically induced prostate carcinogenesis: distinct time-course prostate cancer progression in the dorsolateral and ventral lobes. *Prostate*, 73(11), 1202-1213.
- Gonzaga, A.C.R. (2013). Estudo comparativo do perfil apoptótico ativado pelas vias intrínseca e extrínseca na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento. Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Gonzalez, F. J. (1990). Molecular genetics of the P-450 superfamily. *Pharmacol Ther*, 45(1), 1-38.
- Gonzalez Pardo, V., Boland, R., & de Boland, A. R. (2008). Vitamin D receptor levels and binding are reduced in aged rat intestinal subcellular fractions. *Biogerontology*, 9(2), 109-118.
- Halloran, B. P., & DeLuca, H. F. (1980). Effect of vitamin D deficiency on fertility and reproductive capacity in the female rat. *J Nutr*, 110(8), 1573-1580.
- Harman, S. M., Metter, E. J., Tobin, J. D., Pearson, J., & Blackman, M. R. (2001). Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(2), 724-731.
- Haussler, M. R., Haussler, C. A., Jurutka, P. W., Thompson, P. D., Hsieh, J. C., Remus, L. S., et al. (1997). The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *J Endocrinol*, 154 Suppl, S57-73.
- Haussler, M. R., Jurutka, P. W., Mizwicki, M., & Norman, A. W. (2011). Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1alpha,25(OH)(2)vitamin D(3): genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 25(4), 543-559.
- Hayashi, N., Sugimura, Y., Kawamura, J., Donjacour, A. A., & Cunha, G. R. (1991). Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol Reprod*, 45(2), 308-321.

- Hayward, S. W., Baskin, L. S., Haughney, P. C., Cunha, A. R., Foster, B. A., Dahiya, R., et al. (1996). Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat (Basel)*, 155(2), 81-93.
- Hayward, S. W., Baskin, L. S., Haughney, P. C., Foster, B. A., Cunha, A. R., Dahiya, R., et al. (1996). Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat (Basel)*, 155(2), 94-103.
- Hayward, S. W., & Cunha, G. R. (2000). The prostate: development and physiology. *Radiol Clin North Am*, 38(1), 1-14.
- Hendrickson, W. K., Flavin, R., Kasperzyk, J. L., Fiorentino, M., Fang, F., Lis, R., et al. (2011). Vitamin D receptor protein expression in tumor tissue and prostate cancer progression. *J Clin Oncol*, 29(17), 2378-2385.
- Hoenderop, J. G., Nilius, B., & Bindels, R. J. (2005). Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev*, 85(1), 373-422.
- Holick, M. F. (2004). Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr*, 79(3), 362-371.
- Holick, M. F. (2006). Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest*, 116(8), 2062-2072.
- Holick, M. F. (2008). The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: mechanisms of action. *Mol Aspects Med*, 29(6), 361-368.
- Holick, M. F., & Chen, T. C. (2008). Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr*, 87(4), 1080S-1086S.
- Holick, M. F., Frommer, J. E., McNeill, S. C., Richtand, N. M., Henley, J. W., & Potts, J. T., Jr. (1977). Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D₃ in skin. *Biochem Biophys Res Commun*, 76(1), 107-114.
- Holick, M. F., MacLaughlin, J. A., Clark, M. B., Holick, S. A., Potts, J. T., Jr., Anderson, R. R., et al. (1980). Photosynthesis of previtamin D₃ in human skin and the physiologic consequences. *Science*, 210(4466), 203-205.
- Holick, M. F., MacLaughlin, J. A., & Doppelt, S. H. (1981). Regulation of cutaneous previtamin D₃ photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator. *Science*, 211(4482), 590-593.
- Holick, M. F., Richtand, N. M., McNeill, S. C., Holick, S. A., Frommer, J. E., Henley, J. W., et al. (1979). Isolation and identification of previtamin D₃ from the skin of rats exposed to ultraviolet irradiation. *Biochemistry*, 18(6), 1003-1008.

- Horst, R. L., Goff, J. P., & Reinhardt, T. A. (1990). Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1,25-dihydroxyvitamin D receptor. *Endocrinology*, 126(2), 1053-1057.
- Hsu, J. Y., Feldman, D., McNeal, J. E., & Peehl, D. M. (2001). Reduced 1 α -hydroxylase activity in human prostate cancer cells correlates with decreased susceptibility to 25-hydroxyvitamin D₃-induced growth inhibition. *Cancer Res*, 61(7), 2852-2856.
- Huhtakangas, J. A., Olivera, C. J., Bishop, J. E., Zanello, L. P., & Norman, A. W. (2004). The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol*, 18(11), 2660-2671.
- INCA 2015. Incidência de Câncer no Brasil. *Instituto Nacional do Câncer - Ministério da Saúde*: <http://www2.inca.gov.br>.
- Isaacs, J. T. (1984). The aging ACI/Seg versus Copenhagen male rat as a model system for the study of prostatic carcinogenesis. *Cancer Res*, 44(12 Pt 1), 5785-5796.
- Jensen, S. S., Madsen, M. W., Lukas, J., Bartek, J., & Binderup, L. (2002). Sensitivity to growth suppression by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ among MCF-7 clones correlates with Vitamin D receptor protein induction. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 81(2), 123-133.
- John, E. M., Schwartz, G. G., Koo, J., Van Den Berg, D., & Ingles, S. A. (2005). Sun exposure, vitamin D receptor gene polymorphisms, and risk of advanced prostate cancer. *Cancer Res*, 65(12), 5470-5479.
- Johnson, J. A., Grande, J. P., Roche, P. C., & Kumar, R. (1996). Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in rat reproductive tissues. *Histochem Cell Biol*, 105(1), 7-15.
- Jones, G., Ramshaw, H., Zhang, A., Cook, R., Byford, V., White, J., et al. (1999). Expression and activity of vitamin D-metabolizing cytochrome P450s (CYP1 α and CYP24) in human nonsmall cell lung carcinomas. *Endocrinology*, 140(7), 3303-3310.
- Jurutka, P. W., Terpening, C. M., & Haussler, M. R. (1993). The 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ receptor is phosphorylated in response to 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ and 22-oxacalcitriol in rat osteoblasts, and by casein kinase II, in vitro. *Biochemistry*, 32(32), 8184-8192.
- Khadzkou, K., Buchwald, P., Westin, G., Dralle, H., Akerstrom, G., & Hellman, P. (2006). 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase and vitamin D receptor expression in papillary thyroid carcinoma. *J Histochem Cytochem*, 54(3), 355-361.
- Kidroni, G., Har-Nir, R., Menezel, J., Frutkoff, I. W., Palti, Z., & Ron, M. (1983). Vitamin D₃ metabolites in rat epididymis: high 24,25-dihydroxy vitamin D₃ levels in the cauda region. *Biochem Biophys Res Commun*, 113(3), 982-989.

- Kinuta, K., Tanaka, H., Moriwake, T., Aya, K., Kato, S., & Seino, Y. (2000). Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology*, 141(4), 1317-1324.
- Kivineva, M., Blauer, M., Syvala, H., Tammela, T., & Tuohimaa, P. (1998). Localization of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor (VDR) expression in human prostate. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 66(3), 121-127.
- Konety, B. R., Leman, E., Vietmeier, B., Arlotti, J., Dhir, R., & Getzenberg, R. H. (2000). In vitro and in vivo effects of vitamin D (calcitriol) administration on the normal neonatal and prepubertal prostate. *J Urol*, 164(5), 1812-1818.
- Konety, B. R., Schwartz, G. G., Acierno, J. S., Jr., Becich, M. J., & Getzenberg, R. H. (1996). The role of vitamin D in normal prostate growth and differentiation. *Cell Growth Differ*, 7(11), 1563-1570.
- Kostner, K., Denzer, N., Muller, C. S., Klein, R., Tilgen, W., & Reichrath, J. (2009). The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Res*, 29(9), 3511-3536.
- Krieg, M., Nass, R., & Tunn, S. (1993). Effect of aging on endogenous level of 5 alpha-dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, and estrone in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate. *J Clin Endocrinol Metab*, 77(2), 375-381.
- Krijnen, J. L., Janssen, P. J., Ruizeveld de Winter, J. A., van Krimpen, H., Schroder, F. H., & van der Kwast, T. H. (1993). Do neuroendocrine cells in human prostate cancer express androgen receptor? *Histochemistry*, 100(5), 393-398.
- Krill, D., DeFlavia, P., Dhir, R., Luo, J., Becich, M. J., Lehman, E., et al. (2001). Expression patterns of vitamin D receptor in human prostate. *J Cell Biochem*, 82(4), 566-572.
- Krishnan, A. V., & Feldman, D. (2011). Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 51, 311-336.
- Kumar, V. L., & Majumder, P. K. (1995). Prostate gland: structure, functions and regulation. *Int Urol Nephrol*, 27(3), 231-243.
- Kure, S., Noshio, K., Baba, Y., Irahara, N., Shima, K., Ng, K., et al. (2009). Vitamin D receptor expression is associated with PIK3CA and KRAS mutations in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18(10), 2765-2772.
- Kwieceński, G. G., Petrie, G. I., & DeLuca, H. F. (1989). Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat. *J Nutr*, 119(5), 741-744.

- Laczko, I., Hudson, D. L., Freeman, A., Feneley, M. R., & Masters, J. R. (2005). Comparison of the zones of the human prostate with the seminal vesicle: morphology, immunohistochemistry, and cell kinetics. *Prostate*, 62(3), 260-266.
- Leman, E. S., Arlotti, J. A., Dhir, R., & Getzenberg, R. H. (2003). Vitamin D and androgen regulation of prostatic growth. *J Cell Biochem*, 90(1), 138-147.
- Leman, E. S., DeMiguel, F., Gao, A. C., & Getzenberg, R. H. (2003). Regulation of androgen and vitamin d receptors by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human prostate epithelial and stromal cells. *J Urol*, 170(1), 235-240.
- Li, Y. C., Kong, J., Wei, M., Chen, Z. F., Liu, S. Q., & Cao, L. P. (2002). 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest*, 110(2), 229-238.
- Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B. H., Krutzik, S. R., et al. (2006). Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*, 311(5768), 1770-1773.
- Luo, W., Karpf, A. R., Deeb, K. K., Muindi, J. R., Morrison, C. D., Johnson, C. S., et al. (2010). Epigenetic regulation of vitamin D 24-hydroxylase/CYP24A1 in human prostate cancer. *Cancer Res*, 70(14), 5953-5962.
- MacLaughlin, J., & Holick, M. F. (1985). Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *J Clin Invest*, 76(4), 1536-1538.
- Mahmoudi, A. R., Zarnani, A. H., Jeddi-Tehrani, M., Katouzian, L., Tavakoli, M., Soltanghoraei, H., et al. (2012). Distribution of vitamin D receptor and 1alpha-hydroxylase in male mouse reproductive tract. *Reprod Sci*, 20(4), 426-436.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83(6), 835-839.
- Mao, G. E., Reuter, V. E., Cordon-Cardo, C., Dalbagni, G., Scher, H. I., DeKernion, J. B., et al. (2004). Decreased retinoid X receptor-alpha protein expression in basal cells occurs in the early stage of human prostate cancer development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13(3), 383-390.
- Marini, F., Bartoccini, E., Cascianelli, G., Voccoli, V., Baviglia, M. G., Magni, M. V., et al. (2010). Effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in embryonic hippocampal cells. *Hippocampus*, 20(6), 696-705.
- Masuyama, H., & MacDonald, P. N. (1998). Proteasome-mediated degradation of the vitamin D receptor (VDR) and a putative role for SUG1 interaction with the AF-2 domain of VDR. *J Cell Biochem*, 71(3), 429-440.

- McKenna, N. J., & O'Malley, B. W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*, 108(4), 465-474.
- McNeal, J. E. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*, 2(1), 35-49.
- McNeal, J. E. (1988). Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol*, 12(8), 619-633.
- Midorikawa, K., Sayama, K., Shirakata, Y., Hanakawa, Y., Sun, L., & Hashimoto, K. (1999). Expression of vitamin D receptor in cultured human keratinocytes and fibroblasts is not altered by corticosteroids. *J Dermatol Sci*, 21(1), 8-12.
- Miller, G. J., Stapleton, G. E., Ferrara, J. A., Lucia, M. S., Pfister, S., Hedlund, T. E., et al. (1992). The human prostatic carcinoma cell line LNCaP expresses biologically active, specific receptors for 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Cancer Res*, 52(3), 515-520.
- Molnar, F. (2014). Structural considerations of vitamin D signaling. *Front Physiol*, 5, 191.
- Morais-Santos, M., Nunes, A. E., Oliveira, A. G., Moura-Cordeiro, J. D., Mahecha, G. A., Avellar, M. C., et al. (2015). Changes in Estrogen Receptor ERbeta (ESR2) Expression without Changes in the Estradiol Levels in the Prostate of Aging Rats. *PLoS One*, 10(7), e0131901.
- Moreno, J., Krishnan, A. V., Swami, S., Nonn, L., Peehl, D. M., & Feldman, D. (2005). Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells. *Cancer Res*, 65(17), 7917-7925.
- Narvaez, C. J., Byrne, B. M., Romu, S., Valrance, M., & Welsh, J. (2003). Induction of apoptosis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in MCF-7 Vitamin D3-resistant variant can be sensitized by TPA. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 84(2-3), 199-209.
- Nemere, I., Farach-Carson, M. C., Rohe, B., Sterling, T. M., Norman, A. W., Boyan, B. D., et al. (2004). Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(OH)2D3 membrane binding protein (1,25D3-MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(19), 7392-7397.
- Okano, T., Tsugawa, N., Morishita, A., & Kato, S. (2004). Regulation of gene expression of epithelial calcium channels in intestine and kidney of mice by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 89-90(1-5), 335-338.
- Oliveira, A. G., Coelho, P. H., Guedes, F. D., Mahecha, G. A., Hess, R. A., & Oliveira, C. A. (2007). 5alpha-Androstane-3beta,17beta-diol (3beta-diol), an estrogenic metabolite of 5alpha-dihydrotestosterone, is a potent modulator of estrogen receptor ERbeta expression in the ventral prostate of adult rats. *Steroids*, 72(14), 914-922.

- Oliveira, R. L., Campolina-Silva, G. H., Nogueira, J. C., Mahecha, G. A., & Oliveira, C. A. (2013). Differential expression and seasonal variation on aquaporins 1 and 9 in the male genital system of big fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. *Gen Comp Endocrinol*, 186, 116-125.
- Pasquali, D., Staibano, S., Prezioso, D., Franco, R., Esposito, D., Notaro, A., et al. (2001). Estrogen receptor beta expression in human prostate tissue. *Mol Cell Endocrinol*, 178(1-2), 47-50.
- Peehl, D. M., Skowronski, R. J., Leung, G. K., Wong, S. T., Stamey, T. A., & Feldman, D. (1994). Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on primary cultures of human prostatic cells. *Cancer Res*, 54(3), 805-810.
- Pelletier, G., Luu-The, V., El-Alfy, M., Li, S., & Labrie, F. (2001). Immunoelectron microscopic localization of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human prostate and mammary gland. *J Mol Endocrinol*, 26(1), 11-19.
- Pollard, M. (1973). Spontaneous prostate adenocarcinomas in aged germfree Wistar rats. *J Natl Cancer Inst*, 51(4), 1235-1241.
- Prins, G. S., & Birch, L. (1993). Immunocytochemical analysis of androgen receptor along the ducts of the separate rat prostate lobes after androgen withdrawal and replacement. *Endocrinology*, 132(1), 169-178.
- Prins, G. S., & Korach, K. S. (2008). The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids*, 73(3), 233-244.
- Risbridger, G. P; Taylor, R.A. (2006). Physiology of the male accessory sex structures: the prostate gland, seminal vesicles, and bulbourethral glands. In: D. N. Jimmy (Ed). *Knobil and Neill=s Physiology of reproduction*. Victoria: Elsevier. Physiology of the male accessory sex structures: the prostate gland, seminal vesicles, and bulbourethral glands, p. 1149-1172.
- Rodriguez, R., Pozuelo, J. M., Martin, R., Henriques-Gil, N., Haro, M., Arriazu, R., et al. (2003). Presence of neuroendocrine cells during postnatal development in rat prostate: Immunohistochemical, molecular, and quantitative study. *Prostate*, 57(2), 176-185.
- Saccone, D., Asani, F., & Bornman, L. (2015). Regulation of the vitamin D receptor gene by environment, genetics and epigenetics. *Gene*, 561(2), 171-180.
- Schleicher, G., Privette, T. H., & Stumpf, W. E. (1989). Distribution of soltritol [1,25(OH)₂-vitamin D₃] binding sites in male sex organs of the mouse: an autoradiographic study. *J Histochem Cytochem*, 37(7), 1083-1086.
- Schwartz, G. G., & Hulka, B. S. (1990). Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? (Hypothesis). *Anticancer Res*, 10(5A), 1307-1311.

- Segersten, U., Correa, P., Hewison, M., Hellman, P., Dralle, H., Carling, T., et al. (2002). 25-hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase expression in normal and pathological parathyroid glands. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(6), 2967-2972.
- Segersten, U., Holm, P. K., Bjorklund, P., Hessman, O., Nordgren, H., Binderup, L., et al. (2005). 25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase expression in breast cancer and use of non-1alpha-hydroxylated vitamin D analogue. *Breast Cancer Res*, 7(6), R980-986.
- Seubwai, W., Wongkham, C., Puapairoj, A., Khuntikeo, N., & Wongkham, S. (2007). Overexpression of vitamin D receptor indicates a good prognosis for cholangiocarcinoma: implications for therapeutics. *Cancer*, 109(12), 2497-2505.
- Shappell, S. B., Thomas, G. V., Roberts, R. L., Herbert, R., Ittmann, M. M., Rubin, M. A., et al. (2004). Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res*, 64(6), 2270-2305.
- Shum, W. W., Da Silva, N., McKee, M., Smith, P. J., Brown, D., & Breton, S. (2008). Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell*, 135(6), 1108-1117.
- Silvagno, F., De Vivo, E., Attanasio, A., Gallo, V., Mazzucco, G., & Pescarmona, G. (2010). Mitochondrial localization of vitamin D receptor in human platelets and differentiated megakaryocytes. *PLoS One*, 5(1), e8670.
- Silvagno, F., Poma, C. B., Realmuto, C., Ravarino, N., Ramella, A., Santoro, N., et al. (2010). Analysis of vitamin D receptor expression and clinical correlations in patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 119(1), 121-124.
- Skowronski, R. J., Peehl, D. M., & Feldman, D. (1993). Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D3 receptors and actions in human prostate cancer cell lines. *Endocrinology*, 132(5), 1952-1960.
- Starka, L., Pospisilova, H., & Hill, M. (2009). Free testosterone and free dihydrotestosterone throughout the life span of men. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 116(1-2), 118-120.
- Sugimura, Y., Cunha, G. R., & Donjacour, A. A. (1986). Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod*, 34(5), 961-971.
- Sun, Y., Niu, J., & Huang, J. (2009). Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Am J Transl Res*, 1(2), 148-162.
- Suzuki, K., Takezawa, Y., Suzuki, T., Honma, S., & Yamanaka, H. (1994). Synergistic effects of estrogen with androgen on the prostate--effects of estrogen on the prostate of androgen-administered rats and 5-alpha-reductase activity. *Prostate*, 25(4), 169-176.

- Suzuki, T., Fujimoto, N., Kitamura, S., & Ohta, S. (2007). Quantitative determination of lobe specificity of mRNA expression of androgen-dependent genes in the rat prostate gland. *Endocr J*, 54(1), 123-132.
- Swami, S., Krishnan, A. V., & Feldman, D. (2011). Vitamin D metabolism and action in the prostate: implications for health and disease. *Mol Cell Endocrinol*, 347(1-2), 61-69.
- Szpirer, J., Szpirer, C., Riviere, M., Levan, G., Marynen, P., Cassiman, J. J., et al. (1991). The Sp1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. *Genomics*, 11(1), 168-173.
- Takakura, I., Creasy, D. M., Yokoi, R., Terashima, Y., Onozato, T., Maruyama, Y., et al. (2014). Effects of male sexual maturity of reproductive endpoints relevant to DART studies in Wistar Hannover rats. *J Toxicol Sci*, 39(2), 269-279.
- Takase, Y., Levesque, M. H., Luu-The, V., El-Alfy, M., Labrie, F., & Pelletier, G. (2006). Expression of enzymes involved in estrogen metabolism in human prostate. *J Histochem Cytochem*, 54(8), 911-921.
- Taylor, R. A., & Risbridger, G. P. (2008). The path toward identifying prostatic stem cells. *Differentiation*, 76(6), 671-681.
- Thomas, J. A., & Keenan, E. J. (1994). Effects of estrogens on the prostate. *J Androl*, 15(2), 97-99.
- Tirado, O. M., Selva, D. M., Toran, N., Suarez-Quian, C. A., Jansen, M., McDonnell, D. P., et al. (2004). Increased expression of estrogen receptor beta in pachytene spermatocytes after short-term methoxyacetic acid administration. *J Androl*, 25(1), 84-94.
- Trump, D. L., Deeb, K. K., & Johnson, C. S. (2010). Vitamin D: considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy. *Cancer J*, 16(1), 1-9.
- van der Rhee, H., Coebergh, J. W., & de Vries, E. (2012). Is prevention of cancer by sun exposure more than just the effect of vitamin D? A systematic review of epidemiological studies. *Eur J Cancer*, 49(6), 1422-1436.
- van Etten, E., & Mathieu, C. (2005). Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 97(1-2), 93-101.
- Wadhwa, P. (2013). An introduction to acinar pressures in BPH and prostate cancer. *Nat Rev Urol*, 10(6), 358-366.
- Wang, Y., Becklund, B. R., & DeLuca, H. F. (2010). Identification of a highly specific and versatile vitamin D receptor antibody. *Arch Biochem Biophys*, 494(2), 166-177.

- Wang, Y., & DeLuca, H. F. (2011). Is the vitamin d receptor found in muscle? *Endocrinology*, 152(2), 354-363.
- Webb, A. R., DeCosta, B. R., & Holick, M. F. (1989). Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D3 by causing its photodegradation. *J Clin Endocrinol Metab*, 68(5), 882-887.
- Woenckhaus, J., & Fenic, I. (2008). Proliferative inflammatory atrophy: a background lesion of prostate cancer? *Andrologia*, 40(2), 134-137.
- Wu, D., Lin, G., & Gore, A. C. (2009). Age-related changes in hypothalamic androgen receptor and estrogen receptor alpha in male rats. *J Comp Neurol*, 512(5), 688-701.
- Xu, Y., Shibata, A., McNeal, J. E., Stamey, T. A., Feldman, D., & Peehl, D. M. (2003). Vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and prostate cancer progression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12(1), 23-27.
- Yang, B., Sun, H., Wan, Y., Wang, H., Qin, W., Yang, L., et al. (2012). Associations between testosterone, bone mineral density, vitamin D and semen quality in fertile and infertile Chinese men. *Int J Androl*, 35(6), 783-792.
- Yang, E. S., & Burnstein, K. L. (2003). Vitamin D inhibits G1 to S progression in LNCaP prostate cancer cells through p27Kip1 stabilization and Cdk2 mislocalization to the cytoplasm. *J Biol Chem*, 278(47), 46862-46868.
- Zehnder, D., Bland, R., Williams, M. C., McNinch, R. W., Howie, A. J., Stewart, P. M., et al. (2001). Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(2), 888-894.
- Zhu, J. G., Ochalek, J. T., Kaufmann, M., Jones, G., & Deluca, H. F. (2013). CYP2R1 is a major, but not exclusive, contributor to 25-hydroxyvitamin D production in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(39), 15650-15655.
- Zierold, C., Mings, J. A., & DeLuca, H. F. (2003). Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and parathyroid hormone. *J Cell Biochem*, 88(2), 234-237.
- Zinser, G. M., McEleney, K., & Welsh, J. (2003). Characterization of mammary tumor cell lines from wild type and vitamin D3 receptor knockout mice. *Mol Cell Endocrinol*, 200(1-2), 67-80.