

BRUNA DE TOLEDO MARIA

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO TRANSPORTE
TRANSEPITELIAL DE CÁLCIO NA PRÓSTATA DE RATOS EM
ENVELHECIMENTO**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro de 2020

BRUNA DE TOLEDO MARIA

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO TRANSPORTE
TRANSEPITELIAL DE CÁLCIO NA PRÓSTATA DE RATOS EM
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 de 2020

043 Maria, Bruna de Toledo.
Expressão de proteínas envolvidas no transporte transepitelial de cálcio na próstata de ratos em envelhecimento [manuscrito] / Bruna de Toledo Maria. – 2020.

87 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Cleida Aparecida de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Próstata. 2. Neoplasias da Próstata. 3. ATPases Transportadoras de Cálcio da Membrana Plasmática. 4. Cálcio. I. Oliveira, Cleida Aparecida de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
BRUNA DE TOLEDO MARIA

326/2020
entrada
1º/2018
2018697476

Às **quatorze horas** do dia **19 de fevereiro de 2020**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO TRANSPORTE TRANSEPITELIAL DE CÁLCIO NA PRÓSTATA DE RATOS EM ENVELHECIMENTO**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Cleida Aparecida de Oliveira**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Cleida Aparecida de Oliveira	UFMG	APROVADA
Dra. Gleide Fernandes de Avelar	UFMG	APROVADA
Dr. Ênio Ferreira	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: 1000 Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 19 de fevereiro de 2020.**

Dr.^a. Cleida Aparecida de Oliveira (Orientadora) Cleida Aparecida de Oliveira

Dr.^a. Gleide Fernandes de Avelar Gleide Fernandes de Avelar

Dr. Ênio Ferreira Ênio Ferreira

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Erika Cristina Jorge
Coordenadora do Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular ICB/UFMG

Erika Cristina Jorge

A presente dissertação foi realizada no Laboratório de Biologia da Reprodução (LABRE) do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Dr.^a Cleida Aparecida de Oliveira. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

À minha maravilhosamente grande família, pelo carinho e apoio.

Em especial, aos meus pais e avós, pelo amor incondicional e pelos ensinamentos que levarei comigo por toda a vida.

*“Lança o barco contra o mar
venha o vento que houver.
E se virar, nada.
Pega a mala que couber
vira a estrada sem saber.
E se perder, calma.”*

Rubel

RESUMO

O cálcio é um segundo mensageiro indispensável para o desempenho de inúmeras funções celulares, incluindo proliferação, sobrevivência e morte celular. O seu transporte através dos epitélios é realizado em três etapas e requer a participação de proteínas como o canal TRPV6, que medeia sua entrada nas células; calbindina, ligante de Ca^{2+} que facilita sua difusão pelo citoplasma e protege a célula contra sinais indesejados; e a bomba PMCA, que promove sua extrusão. O envelhecimento é um processo complexo marcado pela ocorrência de desregulações nas vias metabólicas celulares, incluindo um desbalanço na homeostase de Ca^{2+} , o que eleva o risco de desenvolvimento de desordens de grande importância clínica, tais como câncer de próstata. Ainda assim, o conhecimento acerca da expressão de TRPV6, PMCA e calbindina em idade avançada e em lesões epiteliais da próstata é escasso. Portanto, objetivou-se mapear essas proteínas envolvidas no transporte transepitelial de Ca^{2+} na próstata saudável e alterada de ratos Wistar, os quais desenvolvem alterações histopatológicas benignas, pré-malignas e malignas similares às observadas na próstata humana. Dois modelos experimentais foram empregados: envelhecimento fisiológico e indução hormonal da carcinogênese por Testosterona + Estradiol (T+E₂). Tecidos-alvo de ratos jovens, assim como as próstatas ventral e lateral de ratos de diferentes idades foram submetidos a *Western blotting* para detecção de TRPV6 e PMCA. Adicionalmente, ensaios imunohistoquímicos foram conduzidos para detecção de ambos os transportadores e calbindina nas próstatas ventral e lateral de ratos em envelhecimento e tratados com T+E₂. TRPV6 e PMCA foram expressos em níveis mais elevados pelas próstatas ventral e lateral, em comparação aos demais lobos. As três proteínas-alvo avaliadas tiveram seus níveis alterados em lesões epiteliais da próstata, sendo que calbindina foi reduzida em lesões proliferativas de PIN e câncer. PMCA também foi reduzida nessas duas lesões, além de metaplasia escamosa, PIA e atrofia, enquanto TRPV6 foi superexpresso por uma subpopulação de células basais, as quais foram mais frequentes em lesões como metaplasia escamosa, PIA e em alguns sítios de câncer. As alterações pontuais na expressão dos transportadores de cálcio em lesões prostáticas frequentes no envelhecimento, assim como a elevada expressão de TRPV6 por uma subpopulação de células basais presentes nessas lesões, são indicativas de falha no controle da disponibilidade de Ca^{2+} intracelular, revelando um possível mecanismo que contribui para o desenvolvimento de desordens altamente prevalentes na próstata senil.

Palavras-chave: Próstata, Câncer de Próstata, Homeostase de Cálcio, TRPV6, Calbindina, PMCA.

ABSTRACT

Calcium is a second messenger crucial for the execution of diverse cellular functions, including cell proliferation, survival and death. Its transport across epithelia is performed in three steps through the action of proteins as the TRPV6 channel, which mediates its influx in the cells; calbindin, calcium binding protein that facilitates its diffusion through the cytoplasm and protects the cell from unintended signals; and the PMCA pump, which promotes its extrusion. Aging is a complex process marked by the occurrence of metabolic deregulations, including a disruption in Ca^{2+} homeostasis that increases the risk for the development of clinically relevant diseases, such as the prostate cancer. Nevertheless, the expression status of TRPV6, PMCA and calbindin in advanced age and in epithelial lesions of the prostate remains to be unravelled. Therefore, we aimed to map these proteins involved in calcium transepithelial transport in the healthy and altered prostates of Wistar rats, which develop benign, premalignant and malignant histopathological lesions similar to those of the human prostate. To this purpose, two experimental models were applied in the present study: physiological aging and hormonal induction of carcinogenesis by Testosterone + Estradiol (T+E₂). Western blotting was performed in target-tissues of young rats, as well as in the ventral and lateral prostates of rats of different ages for the detection of TRPV6 and PMCA. Additionally, immunohistochemical assays were conducted for the detection of both transporters and calbindin in the ventral and lateral prostates of aging and T+E₂-treated rats. TRPV6 and PMCA were expressed in higher levels by the ventral and lateral prostates, when compared to the other prostate lobes. The three target-proteins of this study had altered expression levels in epithelial lesions of the prostates, with reduced calbindin detection in the proliferative lesions PIN and cancer. PMCA was reduced in these two lesions as well, and also in squamous metaplasia, PIA and atrophy, whereas TRPV6 was overexpressed by a subset of basal cells more frequently present in squamous metaplasia, PIA and some sites of cancer. The punctually changed expression of calcium transporters in prostatic lesions commonly found upon aging, as well as the increased expression of TRPV6 by a subset of basal cells present in these lesions, are suggestive of a failure in the control of intracellular calcium availability, and reveal a possible mechanism contributing to the development of highly prevalent disorders in the senile prostate.

Keywords: Prostate, Postate Cancer, Calcium Homeostasis, TRPV6, Calbindin, PMCA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do complexo prostático de roedores (A) e próstata humana (B).	14
Figura 2. Histologia e ultraestrutura do epitélio glandular da próstata.	16
Figura 3. Metaplasia escamosa da próstata de camundongo adulto em comparação ao epitélio normal.	22
Figura 4. Representação esquemática das alterações histopatológicas observadas em lesões de PIA e PIN.	24
Figura 5. Representação esquemática de diferentes arquiteturas acinares em HGPIN.	25
Figura 6. Representação esquemática da organização histopatológica de adenocarcinoma prostático bem diferenciado.	28
Figura 7. Representação esquemática da absorção do íon cálcio nos epitélios intestinal e renal.	30
Figura 8. Representação esquemática de canal TRPV5/6 observado do meio extracelular.	31
Figura 9. Níveis de expressão dos canais de cálcio TRPV6 (A) e TRPV5 (B) em diferentes órgãos de camundongos.	32
Figura 10. Representação da estrutura molecular da proteína ligante de cálcio calbindina.	33
Figura 11. Representação esquemática da ATPase de Ca^{2+} de membrana plasmática, em sua conformação ativa.	35
Figura 12. Prevalência estimada para diferentes cânceres em homens de todo o mundo em 2018.	39
Figura 13. Nível de expressão de TRPV6 (A) e PMCA (B) no complexo prostático, rim, duodeno e fígado de ratos Wistar.	51
Figura 14. Nível de expressão de TRPV6 (A) e PMCA (B) na próstata ventral e lateral de ratos Wistar em diferentes idades.	52
Figura 15. Localização de TRPV6 no epitélio normal das próstatas ventral e lateral de ratos Wistar em diferentes idades.	54
Figura 16. TRPV6 é mais expresso por células basais CK14-positivas em diferentes lesões da próstata lateral de ratos Wistar.	56

Figura 17. Frequência de células basais intensamente marcadas para TRPV6 em lesões da próstata lateral de ratos Wistar.	57
Figura 18. Localização de TRPV6 em adenocarcinoma bem diferenciado da próstata de ratos Wistar.	59
Figura 19. Localização de PMCA no epitélio normal e alterado das próstatas ventral e lateral de rato Wistar.	61
Figura 20. Localização de TRPV6, PMCA e calbindina em HGPIN de arquitetura cribriforme da próstata ventral de ratos Wistar.	62
Figura 21. Localização de calbindina no epitélio normal e alterado das próstatas ventral e lateral de ratos Wistar.	64
Figura 22. Localização de TRPV6, PMCA e calbindina em adenocarcinoma bem diferenciado da próstata de ratos Wistar	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo de imunohistoquímica empregado para cada proteína-alvo e anticorpos utilizados.	45
Tabela 2. Incidência de lesões epiteliais prostáticas na próstata de ratos Wistar aos 18 meses de idade.	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AP	Próstata anterior ou glândula de coagulação
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaBP	Proteína ligante de cálcio
CaM	Calmodulina
cb	Célula basal
cb-TRPV6 ⁺⁺	Células basais intensamente coradas para TRPV6
CK	Citoqueratina
DHT	Dihidrotestosterona
DP	Próstata dorsal
E ₂	17β-estradiol
ERβ	Receptor de Estrógeno tipo 2
H&E	Hematoxilina e eosina
HPB	Hiperplasia prostática benigna
IP3R	Receptores 1,4,5-inositol-trifosfato
LP	Próstata lateral
NCX	Trocador de íons sódio e cálcio
PBS	Tampão salina fosfato, pH 7,4
PIA	Atrofia inflamatória proliferativa
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase de membrana plasmática
PTH	Hormônio da paratireoide ou paratormônio
qRT-PCR	PCR quantitativo via transcriptase reversa
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RXR	Receptor retinoide X
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SEM	Erro padrão da média
T+E ₂	Testosterona + estradiol
T	Testosterona

TBS	Tampão Tris, pH 7,4
TRP	Receptores de potencial transitório
TRPV	Receptores vaniloide de potencial transitório
UA	Unidade arbitrária
VDR	Receptor de vitamina D
VP	Próstata ventral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
1.1	Morfofisiologia da próstata.....	13
1.1.1	Células luminais.....	14
1.1.2	Células basais.....	15
1.1.3	Células neuroendócrinas.....	17
1.1.4	Estroma.....	18
1.2	Regulação hormonal da próstata.....	18
1.3	Envelhecimento e desordens prostáticas.....	20
1.3.1	Metaplasia escamosa.....	21
1.3.2	Hiperplasia.....	22
1.3.3	Prostatite e abscesso.....	22
1.3.4	Atrofia.....	23
1.3.5	Neoplasia intraepitelial prostática.....	24
1.3.6	Adenocarcinoma.....	26
1.4	Transporte transepitelial de cálcio.....	28
1.4.1	Influxo de cálcio.....	30
1.4.2	Tamponamento de cálcio.....	33
1.4.3	Efluxo de cálcio.....	34
1.5	Sinalização de cálcio e carcinogênese.....	36
2	JUSTIFICATIVA.....	38
3	OBJETIVOS.....	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1	Animais.....	42
4.2	Coleta e processamento de tecidos.....	43
4.3	Histopatologia.....	43
4.4	Imunohistoquímica.....	44
4.5	Imunofluorescência.....	46
4.6	Extração proteica.....	47
4.7	Western blotting.....	47
4.8	Índices quantitativos de imunomarcção.....	48
4.9	Análises estatísticas.....	49
5	RESULTADOS.....	50
5.1	Expressão de TRPV6 e PMCA em tecidos-alvo.....	50
5.2	Imunolocalização de TRPV6 na próstata saudável e alterada.....	52
5.3	Imunolocalização de PMCA na próstata saudável e alterada.....	60
5.4	Imunolocalização de calbindina na próstata saudável e alterada.....	63
6	DISCUSSÃO.....	66
7	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Morfofisiologia da próstata

A próstata é uma glândula sexual anexa do sistema genital masculino, localizando-se no interior da cavidade pélvica, imediatamente abaixo do colo da bexiga. Ela possui organização ducto-alveolar, na qual um complexo sistema de ductos ramificados conduz as secreções produzidas nos ácinos até o lúmen da porção proximal da uretra (Risbridger & Taylor, 2006).

Em roedores, a próstata possui organização multilobar, sendo dividida, de acordo com sua localização em relação à uretra, em quatro pares de lobos, sendo eles a próstata ventral (VP), próstata lateral (LP), próstata dorsal (DP) e próstata anterior (AP, anteriormente denominada glândula de coagulação) (**Figura 1**) (Hayashi, *et al.*, 1991; Risbridger & Taylor, 2006).

Essa disposição difere da observada para a próstata humana que é alobar, organizada em zonas concêntricas, que assim como em roedores, são classificadas de acordo com sua localização em relação à uretra em: zona de transição, zona central e zona periférica (**Figura 1**). Ainda, é possível identificar uma quarta região anatômica, denominada zona anterior, a qual diferentemente das demais, é composta por tecido fibromuscular, sendo, portanto, aglandular (McNeal, 1988).

Em ambas as espécies, a regionalização da próstata distingue-se não apenas pela organização anatômica, mas também pelo desenvolvimento de alterações histopatológicas. Dessa forma, a zona de transição está disposta ao redor da uretra proximal sendo a região onde se observa, com maior frequência, desenvolvimento de hiperplasia prostática benigna (HPB). Por esta razão, o acometimento da próstata por HPB é comumente acompanhado por compressão da uretra e desconforto durante a micção. A zona central, porção que circunda os ductos ejaculatórios, é raramente acometida por desordens prostáticas. Por sua vez, a zona periférica, que corresponde à maior parte do volume da próstata humana, envolve a uretra distal e as demais zonas anatômicas, sendo o principal alvo de distúrbios inflamatórios e onde geralmente se origina o adenocarcinoma prostático (**Figura 1**) (McNeal, 1988; Shappell, *et al.*, 2004).

Acredita-se que os lobos prostáticos de ratos e camundongos sejam histopatologicamente correspondentes às zonas prostáticas humanas, sendo a próstata anterior correspondente à zona central e as próstatas lateral e dorsal, à zona periférica humana, sendo mais frequentemente

acometidas por alterações proliferativas, como o câncer (**Figura 1**) (Lee, *et al.*, 2011). Não há evidências de que a próstata ventral seja homóloga a qualquer das zonas prostáticas humanas, porém esse lobo também é espontaneamente acometido por desordens prostáticas (Moraes-Santos, *et al.*, 2015, 2018; Campolina-Silva, *et al.*, 2018).

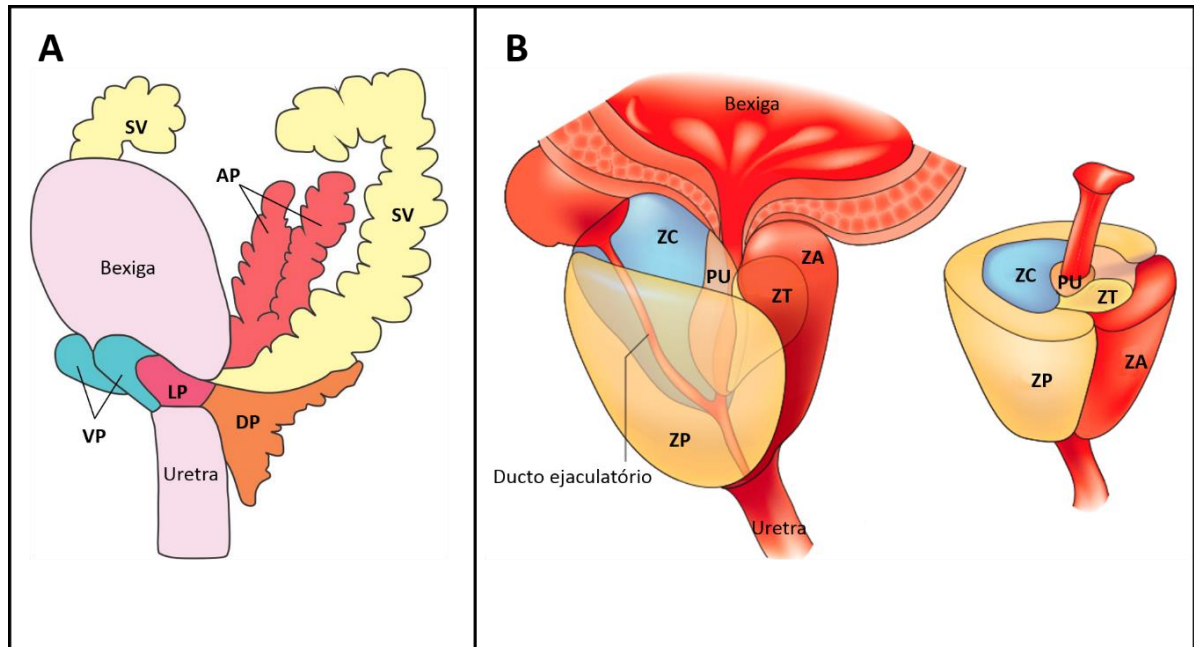


Figura 1. Representação esquemática do complexo prostático de roedores (A) e próstata humana (B). (A) VP: próstata ventral, LP: próstata lateral, DP: próstata dorsal, AP: próstata anterior, SV: vesícula seminal. Adaptado de (Sugimura, et al., 1986). (B) ZT: zona de transição, ZC: zona central, ZP: zona periférica, ZA: zona anterior ou fibromuscular, PU: região glandular periuretral. Adaptado de De Marzo, et al., 2007.

A principal função da próstata é produzir, armazenar e secretar o líquido prostático, composto por enzimas, lipídeos, íons e aminas, desempenhando assim papel de destaque na nutrição, viabilidade e motilidade dos espermatozoides (Kumar & Majumder, 1995). Três tipos celulares podem ser identificados no epitélio prostático: a) células luminiais; b) células neuroendócrinas; e c) células basais.

1.1.1 Células luminiais

Células luminiais, também chamadas células secretoras, possuem elevada atividade secretória, sendo responsáveis pela síntese e secreção da maior parte dos componentes do líquido prostático, incluindo grandes quantidades de citrato, assim como de leucina aminopeptidase e fosfatase ácida. A abundante quantidade de citrato, um ânion orgânico, lançado no fluido

prostático cria condições eletroquímicas adequadas para que cátions como potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) sejam acumulados em níveis muito superiores aos encontrados em outros fluidos biológicos (Huggins, *et al.*, 1942; Kavanagh, 1985). Células luminiais secretam ainda diversas enzimas proteolíticas, como ativadores de plasminogênio e antígeno específico da próstata (PSA), que são essenciais para a liquefação do sêmen coagulado após a ejaculação, permitindo que os espermatozoides se movimentem livremente pelo trato genital feminino (Kavanagh & Darby, 1982; Prins & Lindgren, 2015).

1.1.2 Células basais

Células basais prostáticas por sua vez, estão localizadas no compartimento basal do epitélio, abaixo ou entre células secretoras e neuroendócrinas e intimamente associadas a estas por desmossomos e interdigitações em suas membranas plasmáticas apical e lateral (**Figura 2**) (Timms, *et al.*, 1976). Células basais também são aderidas à membrana basal prostática através de hemidesmossomos, nos quais espessos filamentos de queratina estão inseridos (Timms, *et al.*, 1976). Elas apresentam citoplasma escasso com projeções citoplasmáticas de tamanho e forma variados, dispostas frequentemente paralelas à membrana basal ou perpendicularmente, em direção ao lúmen, de forma que se acredita serem responsáveis por monitorar o fluido prostático e promover a comunicação entre componentes epiteliais e estromais, participando assim da manutenção da homeostase tecidual (Soeffing & Timms, 1995; Hayward, *et al.*, 1996a; Shum, *et al.*, 2008). A abundância de células basais é uma característica variável entre as espécies, de modo que é importante salientar a presença de uma camada virtualmente contínua de células basais no epitélio prostático humano, sendo cerca de dez vezes mais numerosas em comparação ao epitélio prostático de ratos (**Figura 2**) (Hayward, *et al.*, 1996b; El-Alfy, *et al.*, 2000; Risbridger & Taylor, 2006).

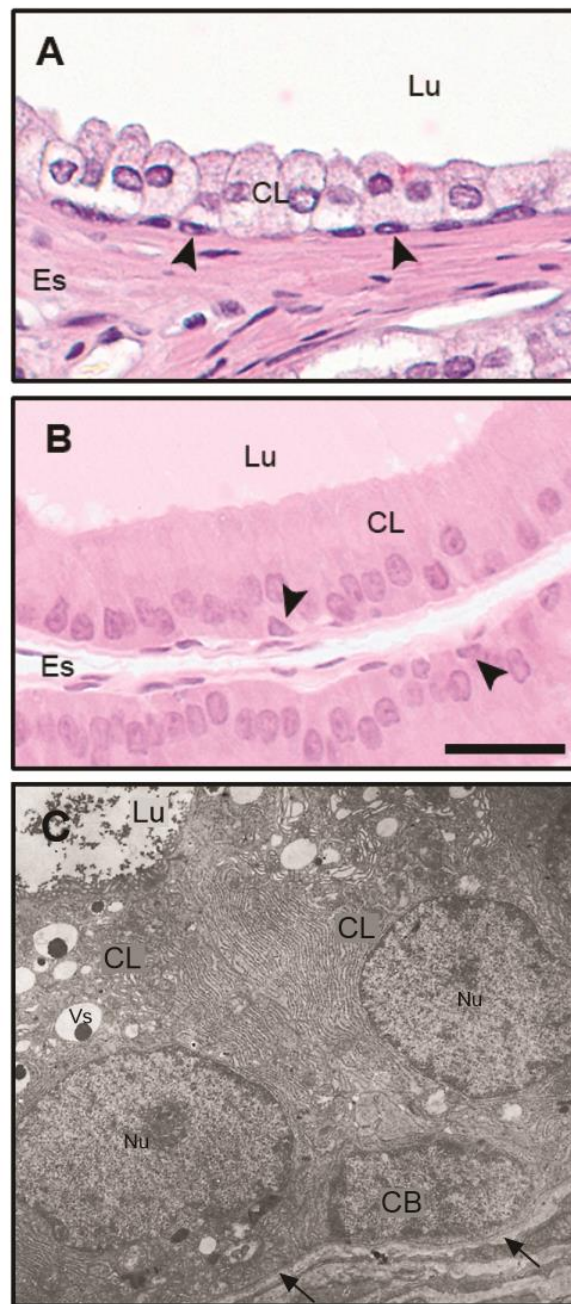


Figura 2. Histologia e ultraestrutura do epitélio glandular da próstata. Cabeças de seta indicam células basais, as quais são observadas em maior frequência no epitélio prostático humano (A) quando comparado ao de rato (B); CL: células luminiais; Es: componentes do estroma; Lu: lúmen. Hematoxilina-Eosina. Barra de escala = 50 μ m. Acervo próprio. (C) eletromicrografia do epitélio da próstata lateral de rato, onde uma célula basal (CB), se encontra interposta entre duas células epiteliais luminiais (CL). Nu: núcleo; Vs: vacúolos secretórios de célula luminal; setas: membrana basal. Adaptado de Timms, et al., 1976.

Estas células não apresentam atividade secretora (Timms, et al., 1976), mas são consideradas células diferenciadas ativas por alguns autores devido à expressão de enzimas esteroideogênicas, incluindo altos níveis de aromatase, responsável pela síntese de 17β -estradiol (E_2) a partir de testosterona (T) (El-Alfy, et al., 2000; Laczkó, et al., 2005; Morais-Santos, et al., 2018). Por outro lado, numerosas são as evidências de que células-tronco, assim como as células

progenitoras da próstata, também compõem a população de células basais, que são independentes de andrógenos para a sua sobrevivência, possuem ciclo celular mais lento que o de células luminais e são capazes de gerar diferentes tipos celulares *in vitro* e *in vivo* (Tsujimura, *et al.*, 2002; Burger, *et al.*, 2005; Taylor & Risbridger, 2006; Wang, *et al.*, 2014; Toivanen, *et al.*, 2016; Moad, *et al.*, 2017).

Por serem candidatas ao desempenho de tantas e tão variadas funções, há uma necessidade de se identificar as diferentes subpopulações de células basais, de modo a contribuir para um melhor entendimento da fisiologia prostática. Nesse sentido, muitos pesquisadores procuram encontrar padrões moleculares que auxiliem no reconhecimento de diferentes tipos de células basais, principalmente de células-tronco prostáticas, utilizando técnicas mais avançadas, como *sorting* de células ativado por fluorescência (FACS) acoplado ao sequenciamento de transcriptoma (RNAseq), ou a convencional imunomarcacão (Tsujimura, *et al.*, 2002; Burger, *et al.*, 2005; Lawson, *et al.*, 2007; Lee, *et al.*, 2014; Liu, *et al.*, 2016; Moad, *et al.*, 2017). Atualmente, sabe-se que as citoqueratinas de alto peso molecular (CK1, CK5, CK10, e CK14), assim como o fator de transcrição p63, o regulador de apoptose Bcl2 e a integrina $\alpha 6$ (CD49f), são moléculas enriquecidas ou expressas exclusivamente em células basais (De Marzo, *et al.*, 1998; Lee, *et al.*, 2014; Liu, *et al.*, 2016).

1.1.3 Células neuroendócrinas

Células neuroendócrinas são detentoras de características mistas neuronais e epiteliais, encontradas dispersas no epitélio prostático humano e correspondendo a cerca de 1 a 2% das células (Laczkó, *et al.*, 2005). Em ratos, as células neuroendócrinas aparentam estar concentradas em ductos periuretrais, sendo raramente observadas em porções glandulares (Aumüller, *et al.*, 2012). Seu papel na regulação hormonal da glândula é pouco conhecido, apesar dos fortes indícios de sua atuação no crescimento, diferenciação e regulação dos processos secretórios glandulares (Abrahamsson & di Sant'Agnese, 1993; Risbridger & Taylor, 2006). Sua identificação apenas é possível através da utilização de marcadores moleculares neuroendócrinos, tais como cromatogranina A, sinaptofisina, serotonina e calcitonina (Laczkó, *et al.*, 2005; Prins & Lindgren, 2015).

1.1.4 Estroma

O estroma prostático difere grandemente entre humanos e roedores em termos de proporção e distribuição de seus componentes. Se por um lado o estroma prostático de ratos é constituído por tecido conjuntivo frouxo, com células musculares lisas dispostas ao redor de adenômeros e ductos; por outro lado, em humanos, abundantes fibras musculares lisas compõem o denso estroma fibromuscular da próstata. Ao contrário de roedores, cujo epitélio possui maior evidência, o estroma é o compartimento tecidual mais abundante da próstata humana (Hayward, *et al.*, 1996c; Shappell, *et al.*, 2004; Risbridger & Taylor, 2006).

Em ambas as espécies, observa-se a presença de nervos, vasos sanguíneos e linfáticos e células de defesa, como leucócitos e mastócitos. Em conjunto, os componentes do estroma prostático desempenham um importante papel modulador da secreção e diferenciação do epitélio, que ocorre através de uma comunicação meticulosamente orquestrada entre os dois compartimentos (Cunha, *et al.*, 1987; Hayward, *et al.*, 1996c; Berry, *et al.*, 2011; Leach, *et al.*, 2015).

1.2 Regulação hormonal da próstata

Sabe-se que o desenvolvimento e a manutenção da morfofisiologia prostática são regulados por andrógenos, sendo a diidrotestosterona (DHT) o principal andrógeno atuante localmente (Wright, *et al.*, 1996). Ambos os hormônios, testosterona (T) e seu metabólito reduzido DHT, atuam através da ligação aos receptores de andrógenos, tendo sido demonstrado, que estes esteroides possuem capacidade de inibir o crescimento das células do estroma prostático e a produção de seus componentes, além de estimular a atividade secretora do epitélio glandular. Os níveis crescentes de andrógenos circulantes no organismo desde o nascimento até o início da puberdade são os responsáveis pelo crescimento e maturação do órgão (Kumar & Majumder, 1995; Risbridger & Taylor, 2006). No entanto, o mecanismo de regulação da próstata é complexo e envolve também outros esteroides e seus respectivos receptores nucleares, tais como estrógenos e vitamina D.

Os estrógenos, popularmente conhecidos como hormônios sexuais femininos, desempenham funções primordiais para a manutenção da homeostase tecidual em ambos os sexos. De modo particular, eles participam ativamente da modulação de atividades celulares do seio urogenital masculino desde o período intrauterino, quando o feto é exposto a altos níveis de estrógenos

provenientes do organismo materno, contribuindo para a organogênese prostática (Prins & Korach, 2008). Sua atuação se dá através da ligação aos receptores de estrógenos de tipo 1 e 2 (ER α e ER β , respectivamente) e se mantém ao longo de toda a vida, o que pode ser reforçado pelo fato de que a próstata de humanos e roedores adultos apresenta ampla expressão de aromatase, enzima responsável pela síntese de estradiol a partir de testosterona (Matzkin & Soloway, 1992; Morais-Santos, *et al.*, 2018). Além disso, camundongos *knockout* para o gene *Cyp19a1*, o qual codifica a aromatase, apresentaram crescimento prostático exacerbado em poucos dias após o nascimento, enfatizando a importância do balanço entre andrógenos e estrógenos para o tecido normal (Risbridger, *et al.*, 2003).

Quanto aos receptores de estrógenos, ER β está presente em células epiteliais prostáticas e, quando ativado, desencadeia respostas principalmente antiproliferativas e pró-diferenciação. Por outro lado ER α é expresso por componentes celulares do estroma, e atua inibindo a diferenciação epitelial e estimulando a proliferação estromal (Weihua, *et al.*, 2002; Imamov, *et al.*, 2004; Guerini, *et al.*, 2005; Prins & Korach, 2008; Dondi, *et al.*, 2010; Mak, *et al.*, 2010; Colciago, *et al.*, 2014).

A vitamina D, por sua vez, é um dos principais hormônios envolvidos na regulação da homeostase de cálcio e fosfato, sendo indispensável para o desenvolvimento adequado do organismo e manutenção da mineralização óssea (Hoenderop, *et al.*, 2001). Ela atua através do seu metabólito ativo, 1,25-dihidroxitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃), também conhecido como calcitriol, que se liga ao receptor de vitamina D (VDR). No presente trabalho, o termo vitamina D será utilizado para designar o hormônio em qualquer de suas formas moleculares, enquanto o termo calcitriol será empregado para referir-se apenas ao metabólito biologicamente ativo.

O complexo calcitriol-VDR se une ao receptor retinoide X (RXR), formando um heterodímero que age em regiões específicas do DNA, conhecidas como elementos responsivos a vitamina D, e modulando assim a transcrição de genes-alvo (Haussler, *et al.*, 1998; Trump, *et al.*, 2010). O complexo calcitriol-VDR-RXR já foi encontrado acoplado a milhares de regiões no genoma (Seuter, *et al.*, 2014), e dentre elas estão as regiões promotoras de genes importantes para o transporte de cálcio, tais como os do Receptor Vaniloide de Potencial Transitório 5 (*TRPV5*), além de Calbindina (*CALBI*) (Hoenderop, *et al.*, 2001).

Há evidências da expressão de VDR no epitélio prostático, assim como a atuação do complexo calcitriol-VDR, como agente antiproliferativo, anti-inflamatório, pró-diferenciação, modulador da atividade secretora celular do epitélio glandular e estimulador de sistemas antioxidantes da

próstata saudável (Peehl, *et al.*, 1994; Leman, *et al.*, 2003; Minelli, *et al.*, 2009). Estes e outros efeitos relacionados à ação de calcitriol-VDR mostraram-se importantes fatores redutores da incidência e severidade de fenótipos do câncer de próstata (Johnson, *et al.*, 1996; Christakos, *et al.*, 2013; Blomberg Jensen, 2014). É importante ressaltar que a próstata, assim como os demais órgãos do sistema genital masculino, funciona sob influência de inúmeros estímulos sinalizadores simultâneos e a ação conjunta de hormônios esteroides, em especial andrógenos, estrógenos e vitamina D, leva a respostas celulares diferentes das observadas quando se estuda a atuação hormonal individual (Leman, *et al.*, 2003).

1.3 Envelhecimento e desordens prostáticas

Sabe-se que um importante desbalanço hormonal se instala paralelamente ao avançar da idade configurando, de maneira especialmente importante para o sistema genital masculino, diminuição drástica na síntese de andrógenos pelas células de Leydig testiculares e consequente redução nos níveis circulantes de testosterona, com níveis inalterados ou aumentados de estrógenos, provocando um desequilíbrio na relação andrógenos/estrógenos. Tal desbalanço hormonal tem sido relatado na literatura como um grande contribuidor para o desenvolvimento de alterações teciduais diversas, incluindo desordens inflamatórias e/ou proliferativas (Banerjee, *et al.*, 2001; Cunha, *et al.*, 2001; Bianco, *et al.*, 2002; Prins & Korach, 2008; Beattie, *et al.*, 2015; Morais-Santos, *et al.*, 2018; Campolina-Silva, *et al.*, 2020).

Simultaneamente à diminuição dos níveis circulantes de andrógenos, observa-se uma queda dos níveis séricos de vitamina D em indivíduos humanos senis, assim como em ratos em idade avançada (Passeri, *et al.*, 2008; Campolina-Silva, *et al.*, 2018). Cerca de 80% da vitamina D atuante no organismo humano é proveniente da epiderme, onde a incidência de radiação ultravioleta provoca a fotólise do seu precursor 7-dihidrocolesterol. O produto é posteriormente metabolizado no fígado e rins para originar o calcitriol (Holick, 2004). Uma vez que o envelhecimento é acompanhado de uma menor concentração de 7-dihidrocolesterol na epiderme, tem-se que a síntese de calcitriol é afetada. Adicionalmente, a mucosa gastrointestinal de indivíduos idosos apresenta uma menor capacidade absorptiva, o que também impacta na captação da vitamina D proveniente da dieta (Holick, 2004; Passeri, *et al.*, 2008).

Estudos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa detectaram significativa redução da expressão de ER β e VDR, aliada a elevados níveis de ER α e aromatase, especificamente em lesões prostáticas de caráter proliferativo em ratos idosos (Morais-Santos, *et al.*, 2015, 2018;

Campolina-Silva, *et al.*, 2018). Associados à alteração dos níveis hormonais, esses dados indicam um relevante desbalanço local, no qual parece haver o favorecimento da atuação de estrógenos via ER α , sendo que estímulos antiproliferativos, antiinflamatórios e pró-diferenciação, promovidos pela ativação de ER β e VDR estariam reduzidos em células epiteliais prostáticas em idade avançada.

Apesar das diferenças anatômicas, a próstata de ratos e camundongos tem sido utilizada como modelo experimental para o estudo da fisiologia prostática devido à similaridade no desenvolvimento da glândula e ao fato de que roedores, em especial os ratos, desenvolvem patologias prostáticas espontâneas, semelhantes às observadas na próstata humana (Pollard, 1973; Xie, *et al.*, 2000; Shappell, *et al.*, 2004). Nesse contexto, a próstata de ratos Wistar revelou-se um excelente modelo de estudo para o desenvolvimento deste trabalho, tendo sido amplamente investigada pelo nosso grupo de pesquisa quanto a pronunciada presença de alterações histológicas em decorrência do processo de envelhecimento (Morais-Santos, *et al.*, 2015, 2018; Campolina-Silva, *et al.*, 2018, 2020). Algumas das alterações observadas com maior frequência no epitélio prostático senil de humanos e ratos são descritas a seguir.

1.3.1 Metaplasia escamosa

O epitélio metaplásico escamoso é caracterizado pela substituição das células epiteliais colunares por múltiplas camadas de células epiteliais achatadas ou de morfologia escamosa em decorrência da proliferação aberrante de células basais, dando origem a um epitélio estratificado pavimentoso (**Figura 3**). É uma alteração proliferativa benigna, mais frequentemente detectada na zona periférica da próstata humana ou em associação a BPH (Shappell, *et al.*, 2004). Seu aparecimento está associado a tratamentos antiandrogênicos para o câncer de próstata e à exposição a estrógenos, de modo que a próstata em desenvolvimento apresenta extenso acometimento por metaplasia escamosa, uma vez que está exposta a altos níveis estrogênicos maternos durante o período gestacional (Risbridger, *et al.*, 2001a; Shappell, *et al.*, 2004; Prins & Korach, 2008). A identificação de tal alteração deve ser realizada preferencialmente utilizando-se métodos histológicos associados à identificação imunohistoquímica de marcadores de células basais, tais como as citoqueratinas de alto peso molecular.

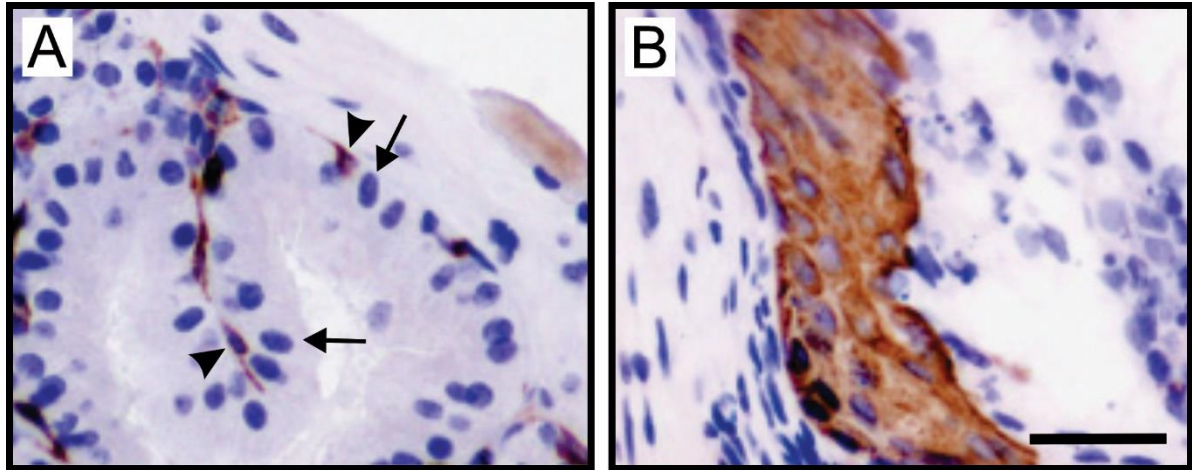


Figura 3. Metaplasia escamosa da próstata de camundongo adulto em comparação ao epitélio normal. (A) O epitélio normal da próstata é pseudoestratificado, com esparsas células basais CK14-positivas (cabeças de seta), de citoplasma escasso e núcleo achatado localizadas entre as células epiteliais luminiais CK14-negativas de núcleo maior e mais arredondado (setas). (B) Imunomarcagem amarronzada mostra epitélio estratificado composto por células basais CK14-positivas. Barra de escala = 50 μ m; contra-coloração: Hematoxilina. Adaptado de Ogura, *et al.*, 2007.

1.3.2 Hiperplasia

A hiperplasia prostática é uma condição proliferativa não-neoplásica de células epiteliais, fibroblastos e miofibroblastos de indivíduos em envelhecimento que, em humanos, acomete principalmente a zona de transição, porção mais intimamente associada à uretra, o que pode provocar sensação de desconforto durante a micção (McNeal, 1988; Begley, *et al.*, 2008). A maior celularidade observada nessa lesão leva à evaginação do epitélio prostático em direção ao lúmen, sem que haja compressão de componentes estromais e interferência na aparência de adenômeros adjacentes (Shappell, *et al.*, 2004). Em humanos, a expansão de grandes porções de tecidos glandulares prostáticos, frequentemente levando ao aparecimento de nódulos macroscópicos, dá nome à desordem Hiperplasia Prostática Benigna, cuja prevalência aumenta significativamente a partir dos 40 anos, atingindo cerca de 50% dos homens na sexta década de vida (Young, *et al.*, 2000).

1.3.3 Prostatite e abscesso

O estroma prostático apresenta maior secreção de mediadores inflamatórios com o envelhecimento (Begley, *et al.*, 2008). Consequentemente, há um maior acúmulo leucocitário no tecido prostático humano e de roedores, sendo que ao atingir proporções de extensa

inflamação periacinar e/ou intraluminal, passa a ser reconhecido como prostatite (Nickel, *et al.*, 1999; Sfanos, *et al.*, 2018; Campolina-Silva, *et al.*, 2020). Respostas imunológicas decorrentes da prostatite podem provocar a ruptura do epitélio glandular, caracterizando um abscesso (Creasy, *et al.*, 2012). A inflamação é uma condição muito comum na próstata adulta e pode estar acompanhada ou não de sintomas, tendo sido correlacionada à proliferação de células epiteliais prostáticas e ao risco de desenvolvimento de câncer (Sfanos, *et al.*, 2018; Campolina-Silva, *et al.*, 2020).

1.3.4 Atrofia

Atrofia é o nome dado à alteração epitelial caracterizada por uma redução da altura do epitélio colunar da próstata, o qual pode assumir padrão cúbico baixo ou pavimentoso. Áreas de atrofia epitelial são mais frequentemente observadas na próstata ventral de ratos a partir dos 12 meses de idade (Morais-Santos, *et al.*, 2015), e em humanos a partir dos 70 anos (McNeal, 1988). Dessa forma, a atrofia é considerada uma condição consequente do processo de envelhecimento, possivelmente causada pela diminuição dos níveis teciduais de andrógenos (McNeal, 1988). Alternativamente, podem ser detectadas glândulas atroficas na próstata de indivíduos aos 40 anos de idade ou mais cedo, sendo, nestes casos, geralmente decorrente de um processo inflamatório prévio (McNeal, 1988).

Em algumas situações, é possível identificar lesão hiperproliferativa, conhecida como atrofia inflamatória proliferativa (PIA), a qual é caracterizada pela atrofia de células epiteliais colunares associada a inflamação e hiperproliferação de células basais (**Figura 4**) (De Marzo, *et al.*, 2016). A PIA pode se desenvolver como uma lesão regenerativa em resposta a danos celulares causados por insultos inflamatórios, de modo que focos de acúmulo leucocitário, espessamento do estroma circundante, assim como enriquecimento de células basais são frequentemente identificados em suas adjacências através de preparos histológicos e imunohistoquímicos (De Marzo, *et al.*, 2016; Pühr, *et al.*, 2016; Campolina-Silva, *et al.*, 2020). A PIA é considerada uma lesão pré-maligna, uma vez que pode ser frequentemente observada em transição direta com neoplasias intraepiteliais prostáticas de alto grau e lesões cancerosas (De Marzo, *et al.*, 2016; Packer & Maitland, 2016; Pühr, *et al.*, 2016; Campolina-Silva, *et al.*, 2020). Além disso, as células epiteliais que compõem a PIA apresentam alterações moleculares, como a maior expressão dos fator de transcrição Bcl-2 e enzima GSTP1, favorecendo a

manutenção de um estado antiapoptótico e pró-sobrevivência, respectivamente (De Marzo, *et al.*, 2016; Packer & Maitland, 2016; Puhr, *et al.*, 2016).

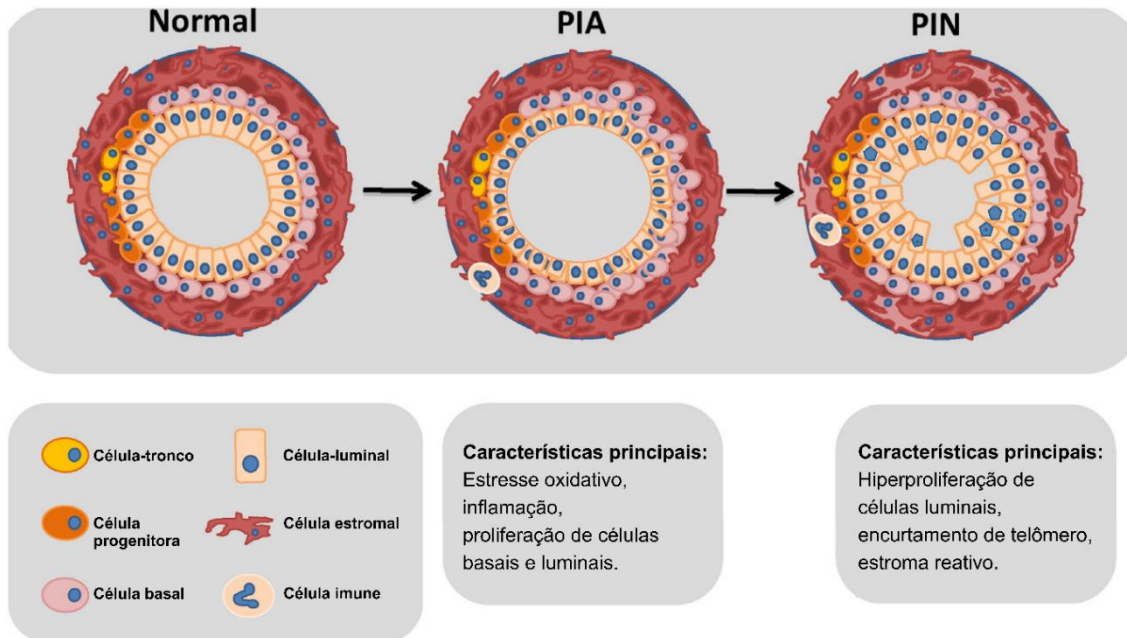


Figura 4. Representação esquemática das alterações histopatológicas observadas em lesões de PIA e PIN. Danos teciduais podem levar à atrofia inflamatória proliferativa (PIA), caracterizada por respostas focais de caráter regenerativo e hiperproliferativo no epitélio. Células basais estão presentes em proporções aumentadas, a altura do epitélio está reduzida e infiltrado inflamatório está geralmente presente nas adjacências da lesão. PIA é postulada como precursora da neoplasia intraepitelial prostática (PIN), na qual a proliferação exacerbada de células luminais leva à estratificação do epitélio e atipias nucleares. PIN também pode estar acompanhada de inflamação. Adaptado de Packer & Maitland, 2016.

1.3.5 Neoplasia intraepitelial prostática

A neoplasia intraepitelial prostática (PIN), anteriormente denominada hiperplasia atípica, é caracterizada pela proliferação de células epiteliais, de tal modo que a estrutura pseudoestratificada normal é parcial ou totalmente substituída por uma organização estratificada (Figura 4). As células frequentemente perdem sua polaridade, adotando diferentes organizações de arquitetura acinar, cujas denominações fazem referência à forma como o epitélio estratificado delimita o espaço luminal (Young, *et al.*, 2000; Puhr, *et al.*, 2016). Assim, PIN podem apresentar arquitetura: a) ondulada; b) plana, na qual a borda apical é linear e uniforme; c) micropapilar, com formação de estruturas similares a papilas; ou d) cribriforme, caracterizado por crescimento semiobstrutivo, formando uma rede ou massa compacta de células epiteliais, onde podem ser observadas pequenas “criptas” luminais (**Figura 5**) (Young,

et al., 2000; Puhr, *et al.*, 2016). A membrana basal localizada sob o epitélio se mantém intacta e a delimitação externa das unidades glandulares afetadas é geralmente uniforme. Dependendo do grau de severidade, células atípicas de citoplasma amplo podem ser observadas, assim como núcleos pleomórficos e hiper cromáticos com nucléolos evidentes (Suwa, *et al.*, 2001; Shappell, *et al.*, 2004; Creasy, *et al.*, 2012).

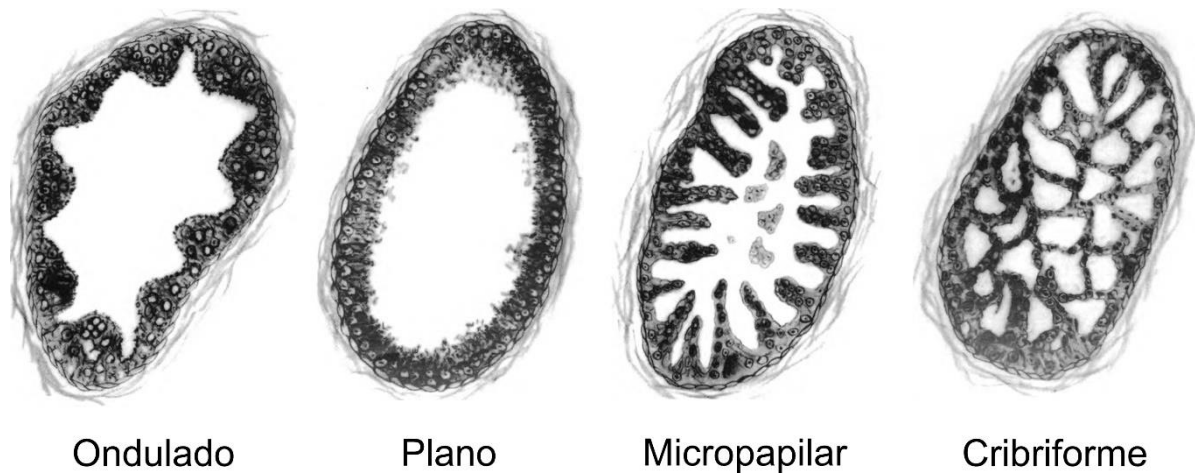


Figura 5. Representação esquemática de diferentes arquiteturas acinares em HGPIN. Células luminiais prostáticas presentes na PIN perdem a polaridade epitelial normal e podem se organizar em padrões de arquitetura ondulada, plana, micropapilar ou cribriforme. Tanto LGPIN quanto HGPIN podem apresentar os quatro padrões de arquitetura, sendo que a diferença entre eles se dá pelo grau de atipia celular e extensão da lesão. Adaptado de Young, *et al.*, 2000.

A classificação de PIN é variável, tendo sido propostos inúmeros índices de estadiamento dependendo das variáveis morfológicas e moleculares avaliadas (Park, *et al.*, 2002; Shappell, *et al.*, 2004; Ittmann, *et al.*, 2013). Park e colaboradores (2002), por exemplo, se utilizaram de uma gama de modelos murinos transgênicos para estabelecer classificação de I a IV; enquanto muitos patologistas recomendam o estadiamento entre alto (HGPIN) e baixo grau (LGPIN) para a classificação da lesão em humanos e modelos animais (Shappell, *et al.*, 2004). Devido à ampla utilização e aceitação na literatura, as denominações HGPIN e LGPIN serão utilizadas no presente trabalho para se referir a PIN de baixo e alto graus, respectivamente. Nesse sentido, PIN são consideradas de baixo grau quando a lesão compromete apenas uma pequena porção do ácino, de modo que o grau de atipia das células é baixo ou moderado. PIN de alto grau geralmente apresentam três ou mais camadas de células atípicas exibindo frequentes núcleos aumentados e nucléolos evidentes. Essa estratificação celular atípica se estende por grande parte do ácino glandular afetado, podendo obstruir o espaço luminal total ou parcialmente, independente da arquitetura acinar observada. Em humanos, HGPIN é considerada a principal lesão precursora do câncer de próstata, devido à sua frequente documentação em associação a

adenocarcinoma invasivo e por apresentar alterações epigenéticas e genéticas características de neoplasias, tais como níveis indetectáveis do fator de transcrição NKX3.1 e a fusão entre porções dos genes adjacentes *TMPRSS2* e *ERG* (Shappell, *et al.*, 2004; De Marzo, *et al.*, 2016; Puhr, *et al.*, 2016).

1.3.6 Adenocarcinoma

Através do processo contínuo de proliferação celular que se dá a partir da quarta década de vida, a próstata sofre aumento gradual em seu volume, o que somado à secreção estromal de mediadores inflamatórios, cria um microambiente adequado para a proliferação e para o desenvolvimento de lesões pré-malignas como PIA e PIN (Risbridger & Taylor, 2006; Begley, *et al.*, 2008; De Marzo, *et al.*, 2016). Consequentemente, a idade se torna um importante fator de risco para o desenvolvimento de HPB e câncer, doenças prostáticas de maior relevância clínica atualmente. Ambas são desordens proliferativas cujas incidências se apresentam notavelmente superiores em indivíduos a partir dos 60 anos de idade, sendo que o câncer de próstata atinge cerca de 75% da população mundial acima dos 65 anos (INCA, 2018).

Em humanos, o diagnóstico e estadiamento do câncer de próstata são realizados através da combinação dos níveis de PSA sérico, presença e volume de tumor palpável ao exame de toque retal e avaliação quanto ao comprometimento de órgãos vizinhos ou distantes. Adicionalmente, é realizada a análise histopatológica de biópsia prostática de acordo com o estadiamento de Gleason, no qual a pontuação do padrão histológico neoplásico predominante é somada à pontuação do padrão neoplásico mais avançado, obtendo-se um *score* de 2 a 10, no qual 10 equivale ao carcinoma menos diferenciado e mais invasivo (Epstein, *et al.*, 2016; SBOC, 2017).

Dentre as neoplasias prostáticas, aquelas advindas de células epiteliais glandulares transformadas, os adenocarcinomas, são as mais comuns e apresentam padrões histológicos variáveis. De modo geral, o adenocarcinoma é identificado a partir da observação de células epiteliais atípicas, cuja razão núcleo/citoplasma está alterada pela presença de núcleos gigantes e/ou altamente pleomórficos e nucléolos proeminentes, em um arranjo que descaracteriza a arquitetura pseudoestratificada normal. Figuras de mitose podem estar presentes e o crescimento de células epiteliais neoplásicas pode ser restrito aos adenômeros prostáticos, levando a obstrução parcial ou total do lúmen glandular, de modo que a lesão é denominada não invasiva. Por outro lado, pode haver formação de pequenas glândulas em que a polarização

celular é mantida, caracterizando o carcinoma bem diferenciado microacinar (**Figura 6**); ou ainda, podem ser encontradas células malignas com morfologia similar à de células mesenquimais, dispostas entre os componentes do estroma prostático, caracterizando câncer invasivo pouco diferenciado (Young, *et al.*, 2000). O adenocarcinoma prostático pode estar acompanhado de espessamento do estroma periacinar e neoformação de vasos sanguíneos, assim como de acúmulo leucocitário em graus variáveis, abscesso e até necrose (Young, *et al.*, 2000). É importante ressaltar que as lesões neoplásicas são consideravelmente diferentes quando comparadas entre espécies, de forma que as diretrizes utilizadas para o diagnóstico e estadiamento do câncer de próstata humano não devem ser aplicadas de forma literal para a classificação de lesões em modelos animais (Shappell, *et al.*, 2004).

Considera-se que a ausência de células basais seja a principal característica do adenocarcinoma prostático (**Figura 6**) (Young, *et al.*, 2000; Packer & Maitland, 2016). Esse fato incita discussões sobre o papel das células basais para a carcinogênese prostática, sendo que alguns autores acreditam que elas seriam as responsáveis pelo desenvolvimento do câncer, perdendo o fenótipo que as caracteriza após a transformação (Bonkhoff, *et al.*, 1994; Stoyanova, *et al.*, 2013; Kwon, *et al.*, 2014). Apesar disso, são relatadas exceções, incluindo o adenocarcinoma intraductal, que mantém uma camada de células basais intacta (Robinson, *et al.*, 2012; Epstein, *et al.*, 2016), e raros casos de tumores CK5- e p63-positivos (Tan, *et al.*, 2015; Le Magnen, *et al.*, 2018; Torres, *et al.*, 2018). Em modelos murinos e em ratos, ambos os tipos celulares prostáticos (luminal e basal) tem seu potencial carcinogênico comprovado, reforçando a importância de se interpretar cuidadosamente os achados provenientes de modelos não-humanos (Packer & Maitland, 2016).

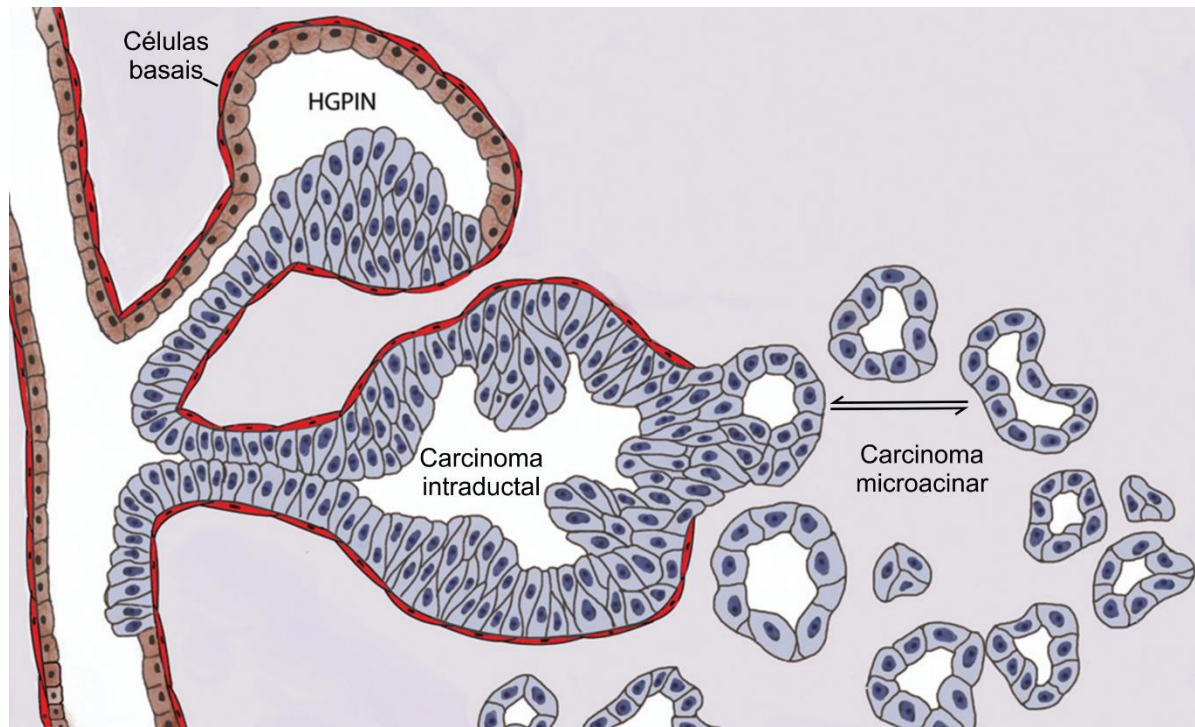


Figura 6. Representação esquemática da organização histopatológica de adenocarcinoma prostático bem diferenciado. O epitélio prostático humano normal (em marrom) é caracterizado por uma camada virtualmente contínua de células basais (em vermelho). HGPIN, considerada lesão precursora do câncer de próstata, apresenta padrões moleculares similares aos da neoplasia (células alteradas em azul). Grosso modo, a progressão tumoral pode seguir dois caminhos: crescimento neoplásico confinado ao ácino glandular, com retenção da camada de células basais (carcinoma intraductal); e/ou invasão do estroma adjacente por grupos de células transformadas (carcinoma microacinar). Alternativamente, pode haver colonização reversa de adenômeros benignos por carcinoma invasivo. Adaptado de Haffner, et al., 2016.

1.4 Transporte transepitelial de cálcio

O cálcio é o cátion mais abundante no organismo humano, sendo a maior parte, cerca de 99%, estocado no tecido ósseo. O 1% restante é distribuído pelo organismo através da circulação, sendo que aproximadamente 46% deste cálcio circulante é conjugado a proteínas como albumina e globulinas, e cerca de 47% (menos de 1% do cálcio corporal), está presente em sua forma livre ou ionizada, atuando como mensageiro intracelular e participando de inúmeros processos orgânicos essenciais, desde a contração muscular até a coagulação sanguínea e muitos outros (Friedman & Gesek, 1995; Ramasamy, 2006). Uma vez livre no citoplasma, o íon cálcio desencadeia uma série de sinais, sendo, portanto, extremamente necessária a atuação de inúmeras proteínas, moléculas e íons ligantes que regulam e mantêm a concentração intracelular basal de Ca^{2+} livre em torno de $0,1 \mu\text{M}$. Dessa forma, pequenas alterações nos níveis deste mensageiro no ambiente celular promovem rápidas respostas moleculares, culminando em inúmeros possíveis processos metabólicos (Friedman & Gesek, 1995; Ramasamy, 2006).

O controle da disponibilidade de cálcio nos diferentes compartimentos orgânicos é complexo, sendo regulado por hormônios chamados calcitropicos, como o paratormônio (PTH) e a vitamina D, que estimulam a captação do íon por enterócitos e a atividade osteoclástica, provocando um maior remodelamento ósseo e aumentando os níveis circulantes de Ca^{2+} quando necessário (Fleet, 2017). Adicionalmente, PTH é o principal responsável por manter a reabsorção de cálcio nos túbulos renais, possibilitando que cerca de 98,5% do que foi filtrado nos glomérulos retorne para a corrente sanguínea (Passeri, *et al.*, 2008).

Tratando-se da sua captação através da dieta ou reabsorção renal, por exemplo, existem duas vias possíveis para o transporte de cálcio entre compartimentos luminiais e o espaço intersticial, de onde ele pode atingir a corrente sanguínea:

- a) a via paracelular, na qual o íon é difundido pelo espaço intercelular, atravessando passivamente as zônulas de oclusão entre as células epiteliais;
- b) e a via transcelular ou transepitelial, caracterizada pelo transporte de Ca^{2+} através do interior das células, em direção à membrana basal.

Na via transcelular, o cálcio é transportado em três etapas que serão abordadas em maior detalhe a seguir (Hoenderop, *et al.*, 2005). De modo resumido, inicialmente, o influxo passivo de Ca^{2+} para o interior da célula ocorre através de canais seletivos localizados na membrana plasmática apical ou luminal das células. Uma vez no citoplasma, os íons cálcio se ligam com alta afinidade a proteínas ligantes de cálcio (CaBP), as quais atuam como tamponantes, evitando a citotoxicidade causada pela presença do íon livre no ambiente intracelular. Simultaneamente, as CaBP direcionam o cálcio para a membrana plasmática basolateral, onde estão presentes bombas e trocadores que promovem a extrusão ativa do cálcio intracelular (**Figura 7**) (Hoenderop, *et al.*, 2005; Lytton, 2007).

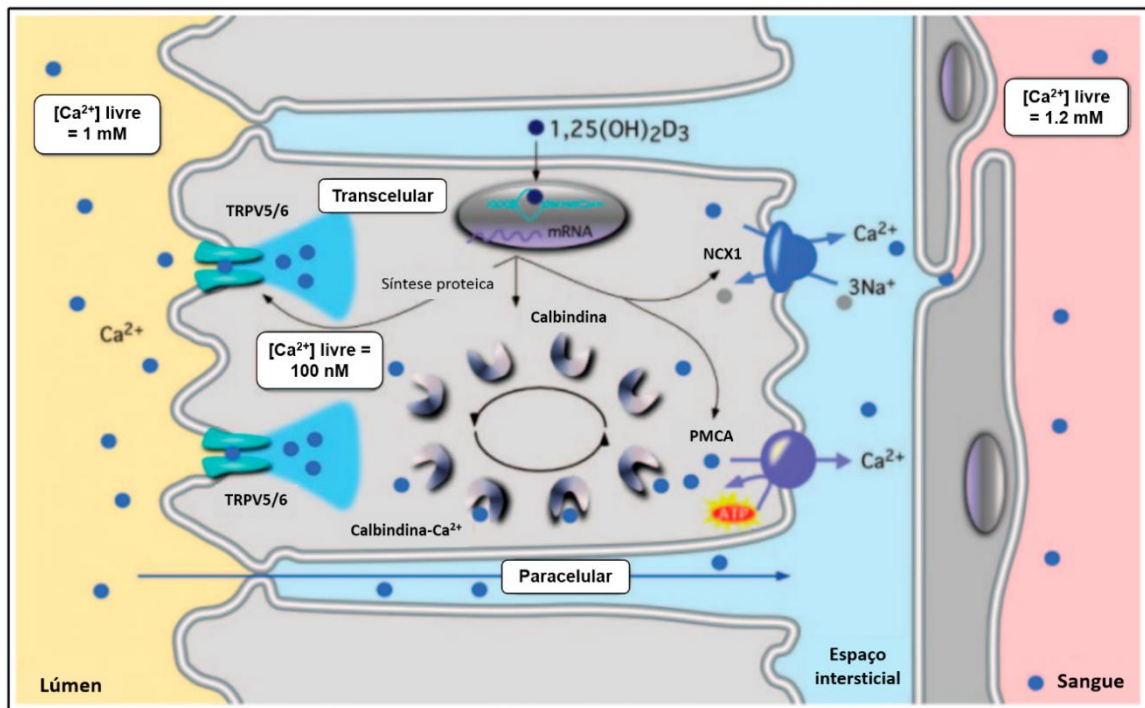


Figura 7. Representação esquemática da absorção do íon cálcio nos epitélios intestinal e renal. Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), é capaz de estimular a transcrição de genes envolvidos no transporte transcelular de cálcio, promovendo a síntese de TRPV5/6, calbindina, NCX1 e PMCA. TRPV5/6 localizados na membrana plasmática apical promove o influxo passivo de Ca^{2+} . Uma vez no citoplasma, Ca^{2+} é reversivelmente ligado a calbindina e posteriormente lançado para o meio extracelular pelo trocador NCX1 ou pela bomba PMCA, ambos localizados nas membranas plasmáticas basolaterais. Alternativamente, no transporte transcelular, o íon pode atravessar passivamente as junções intercelulares para atingir a corrente sanguínea. Adaptado de Hoenderop, et al., 2005.

1.4.1 Influxo de cálcio

O influxo de cálcio para o interior das células é mediado por diversos canais proteicos, e ocorre sob estímulos variados em diferentes tipos celulares, incluindo a ligação de agonistas como ATP e neurotransmissores a receptores específicos, estresse celular e alterações no gradiente intracelular de Ca^{2+} . A superfamília de Receptores de Potencial Transitório (TRP, *Transient Receptor Potential*), composta por canais proteicos seletivos para cátions, possui ampla participação no transporte de Ca^{2+} , sendo os canais da subfamília Vaniloide (TRPV, *Transient Receptor Potential Vanilloid-Related*), os principais responsáveis pela modulação do influxo do íon cálcio para o meio intracelular (Den Dekker, et al., 2003; Hoenderop, et al., 2005).

A subfamília TRPV possui seis membros, sendo os canais epiteliais de cálcio TRPV5 e TRPV6 (anteriormente conhecidos como ECaC1 e ECaC2, ou CaT2 e CaT1, respectivamente),

extensivamente descritos na literatura como canais proteicos envolvidos na manutenção do balanço corporal de Ca^{2+} , agindo principalmente como facilitador de sua absorção e reabsorção no intestino e rins, respectivamente (Hoenderop, *et al.*, 2005). Estruturalmente, os canais TRPV5/6 são compostos por tetrâmeros detentores de seis domínios transmembranares e uma região hidrofóbica formadora do poro permeável ao íon cálcio (**Figura 8**) (Den Dekker, *et al.*, 2003).

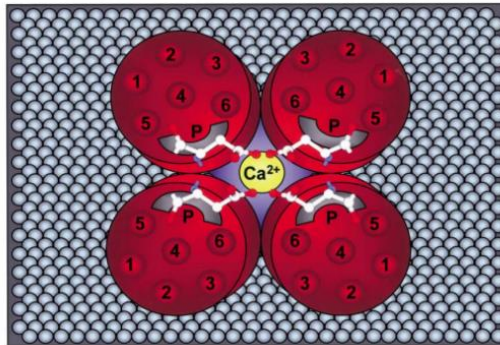


Figura 8. Representação esquemática de canal TRPV5/6 observado do meio extracelular. O canal é formado por quatro subunidades, as quais apresentam seis domínios transmembranares (1 a 6), um curto segmento hidrofóbico (P), que compõe o poro, entre o quinto e o sexto domínio, e sítios regulatórios localizados em sua porção citoplasmática (não visualizada na representação acima). Fonte: Den Dekker, *et al.*, 2003.

Nijenhuis e colaboradores (2003) demonstraram através de análise por PCR quantitativo (qRT-PCR), que a distribuição destes transportadores abrange uma grande variedade de tecidos (**Figura 9**). Neste estudo, transcritos de *Trpv6* foram predominantes em tecidos de camundongo, sendo altamente expresso na próstata; enquanto transcritos de *Trpv5* foram detectados principalmente nos rins e tecido ósseo (Nijenhuis, *et al.*, 2003). Assim, dentre esses dois canais TRPV seletivos para o íon Ca^{2+} , TRPV6 foi eleito como alvo de investigação no presente trabalho.

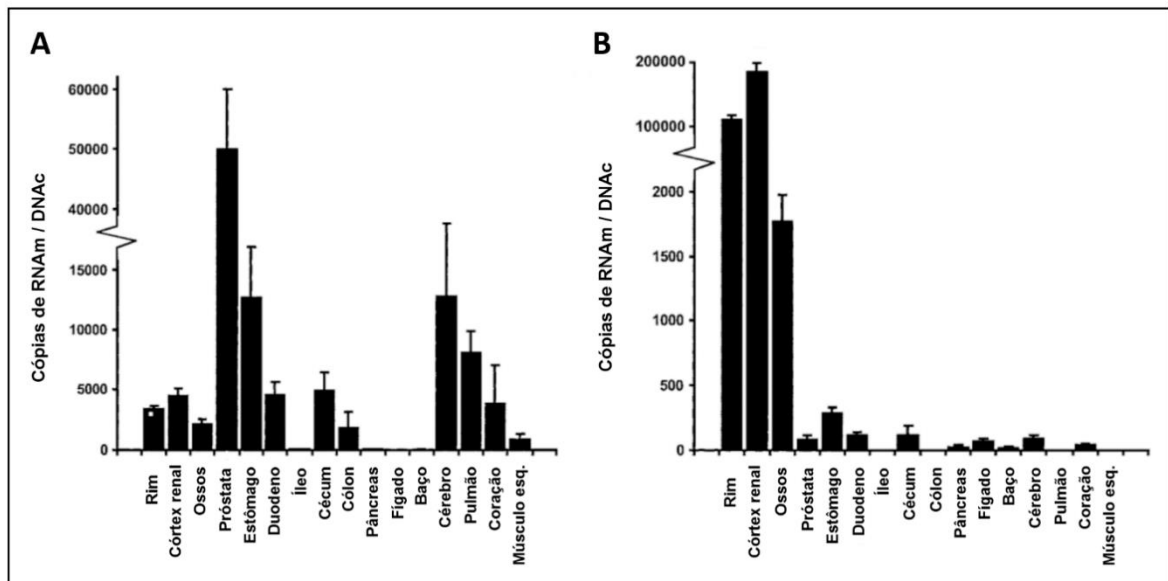


Figura 9. Níveis de expressão dos canais de cálcio TRPV6 (A) e TRPV5 (B) em diferentes órgãos de camundongos. Adaptado de Nijenhuis, et al., 2003.

Os níveis de expressão de cada canal TRPV varia entre os órgãos dependendo da espécie analisada, sendo possível observar predominância de TRPV5 ou TRPV6 no mesmo tecido em espécies diferentes (Na & Peng, 2014). Além disto, essas duas isoformas, que compartilham cerca de 75% de homologia em suas sequências de aminoácidos, possuem capacidade de formar homo e heterotetrâmeros nos tecidos em que ambos são expressos, de maneira que as características físico-químicas do canal se aproximam às características de uma ou outra isoforma, dependendo da quantidade de monômeros de TRPV5 ou TRPV6 presente (Den Dekker, et al., 2003; Hoenderop, et al., 2005).

A atividade dos canais TRPV5 e TRPV6 é controlada por quatro mecanismos conhecidos (Den Dekker, et al., 2003; Van der Graaf, et al., 2003; Hoenderop, et al., 2005), sendo eles:

- inibição da atividade dos canais através da ligação de íons Mg^{2+} no poro, na situação em que a concentração luminal de Ca^{2+} se encontra reduzida;
- recuperação da inibição, que se dá pela substituição dos íons Mg^{2+} por Ca^{2+} quando o gradiente de cálcio é retomado;
- níveis hormonais e de cálcio proveniente da dieta, os quais determinam a quantidade de canais expressos;

- d) interação dos canais com moléculas citoplasmáticas, incluindo CaBP como as calbindinas e enzimas dependentes de cálcio que podem inativar TRPV por mecanismo de *feedback* negativo.

1.4.2 Tamponamento de cálcio

As CaBP pertencem à superfamília de proteínas *EF hand*, a qual possui mais de 200 membros. Elas compõem um grupo muito amplo e diverso, sendo classificadas como sensores ou tamponantes de Ca^{2+} . Estas proteínas apresentam, como principais características, alta afinidade e especificidade de ligação reversível a cátions divalentes através de sítios de ligação, compostos por α hélices E e F intercaladas por uma alça rica em resíduos ácidos (**Figura 10**) (Tsigelny, *et al.*, 2000; Christakos, *et al.*, 2018). CaBP, dentre as quais estão calmodulina, parvalbumina, troponina C, calbindina e proteína S100G, participam de inúmeras funções celulares através da modulação dos sinais desencadeados por cálcio, sendo que as duas últimas destacam-se como principais componentes tamponantes da via transcelular de transporte de cálcio (Hoenderop, *et al.*, 2005; Islam, 2012). Calbindina (calb) e proteína S100G, anteriormente denominadas calbindina-D_{28k} e calbindina-D_{9k}, respectivamente, são capazes de se ligar a outros cátions, como Cd^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} com menor afinidade, sendo que enquanto calbindina possui quatro sítios ativos de ligação ao Ca^{2+} (**Figura 10**), S100G possui apenas dois domínios de ligação ao íon (Li, *et al.*, 1998; Christakos, *et al.*, 2018).

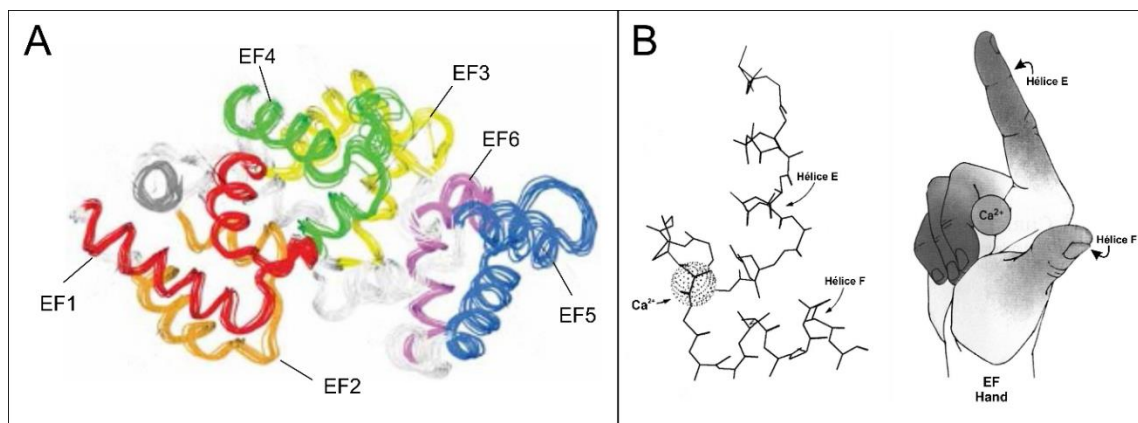


Figura 10. Representação da estrutura molecular da proteína ligante de cálcio calbindina. (A) Os seis domínios EF de calb estão indicados em: vermelho (EF1), laranja (EF2), amarelo (EF3), verde (EF4), azul (EF5), e roxo (EF6) (Adaptado de Kojetin, *et al.*, 2006). (B) Cada domínio EF apresenta estrutura molecular que pode ser comparada a uma mão, onde o dedo indicador seria a hélice E e o polegar, a hélice F (Adaptado de Christakos, *et al.*, 2018).

A expressão de calbindina e S100G foi descrita em diversos tecidos de mamíferos e aves (Darwish, *et al.*, 1991; Dowd, *et al.*, 1992; Inpanbutr & Taylor, 1992; Li, *et al.*, 1998; Loffing, *et al.*, 2001; Oliveira, *et al.*, 2012; Na & Peng, 2014). Acredita-se que nos intestino e rins, tecidos onde ocorre absorção e reabsorção maciça de cálcio, respectivamente, a regulação da expressão destes ligantes é feita principalmente via calcitriol (Li, *et al.*, 1998), enquanto nos demais tecidos, essa regulação também seria dependente de fatores locais específicos, como estrógenos (Darwish & DeLuca, 1992; Criddle, *et al.*, 1997), e andrógenos (Hoenderop, *et al.*, 2005). Além do tamponamento e direcionamento dos íons cálcio para a membrana basolateral, calbindina também possui papel de sensor de Ca^{2+} (Kojetin, *et al.*, 2006), regulador da atividade da ATPase de Ca^{2+} de membrana plasmática (Reisner, *et al.*, 1992) e, na ausência de Ca^{2+} , dos canais TRPV5/6 (Na & Peng, 2014).

1.4.3 Efluxo de cálcio

A extrusão do Ca^{2+} intracelular ocorre contra um alto gradiente eletroquímico, sendo necessária a atuação de duas bombas presentes na membrana basolateral celular: trocador de sódio e cálcio (NCX) e ATPase de cálcio de membrana plasmática (PMCA).

O trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ possui três isoformas identificadas em mamíferos e atua transportando de três a quatro íons sódio para cada íon cálcio, sendo que o movimento do cálcio pode ser bidirecional dependendo especialmente do gradiente eletroquímico (Hoenderop, *et al.*, 2000; Hoenderop, *et al.*, 2005; Lytton, 2007). Carreadores NCX destacam-se principalmente em células excitáveis, como neurônios e fibras miocárdicas, devido à sua alta capacidade de transporte e baixa afinidade aos íons carreados, o que permite a expulsão eficaz de todo o cálcio utilizado para o estímulo celular (Carafoli, 1991). Por outro lado, as mesmas características que tornam NCX um excelente sistema de extrusão de cálcio ao final do ciclo funcional celular, também levam a uma participação mínima dessa bomba na manutenção dos níveis basais de Ca^{2+} na célula em repouso e em células não-excitáveis (Carafoli, 1991; Brandenburger, *et al.*, 2011; Bruce, 2013), sendo esta a razão pela qual ela não será abordada de maneira aprofundada neste estudo.

Ao contrário de NCX, a PMCA possui menor capacidade de transporte e alta afinidade ao Ca^{2+} , sendo descrita como o principal mecanismo de manutenção da concentração basal de cálcio

livre no meio intracelular em diversos tecidos (Carafoli, 1991; Wilhelm, *et al.*, 2008; Brandenburger, *et al.*, 2011; Bruce, 2013; Wolf & Wennemuth, 2014). PMCA oscila entre o estado de repouso e o estado ativo, de forma que sua atividade é precisamente regulada pela interação de seus domínios citoplasmáticos com adenosina trifosfato (ATP), complexo Ca^{2+} -calmodulina (Ca^{2+} -CaM) e fosfolipídeos, ou pela mudança conformacional marcada pela ligação da cauda C-terminal com o sítio catalítico, na ausência de Ca^{2+} -CaM, o que inibe a extrusão do íon cálcio (**Figura 11**) (Bruce, 2013).

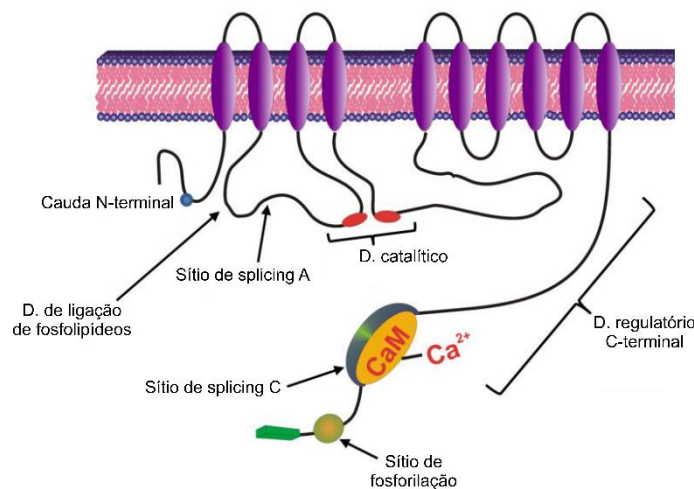


Figura 11. Representação esquemática da ATPase de Ca^{2+} de membrana plasmática, em sua conformação ativa. PMCA apresenta dez domínios transmembranares e quatro domínios citoplasmáticos, sendo eles: cauda N-terminal, região de ligação a fosfolipídeos, região contendo sítios catalíticos e de ligação ao ATP, e C-terminal regulador da atividade da bomba, contendo domínios de ligação à calmodulina. Adaptado de Bruce, 2013.

As PMCA são decodificadas por quatro genes que dão origem às isoformas PMCA1 a PMCA4, e mais de 30 variantes por *splicing* alternativo, permitindo sua ampla distribuição no organismo (Hoenderop, *et al.*, 2000; Hoenderop, *et al.*, 2005; Brandenburger, *et al.*, 2011; Wolf & Wennemuth, 2014). As isoformas PMCA1 e PMCA4 são consideradas constitutivas e podem ser encontrados em todos os tipos teciduais, enquanto PMCA2 e PMCA3 estão restritas a células excitáveis como neurônios e fibras musculares (Stauffer, *et al.*, 1993). Acredita-se que o grande número de variantes proteicas que podem ser geradas a partir de quatro sequências gênicas torna possível uma distribuição capaz de satisfazer as necessidades individuais de cada tecido ou tipo celular.

No sistema genital masculino, PMCA4 mostrou ser a isoforma predominante, desempenhando papel crucial no desenvolvimento e capacitação espermática em roedores, por exemplo

(Brandenburger, *et al.*, 2011). Em relação à próstata, Post e colaboradores (2008), relataram a presença de PMCA1 e PMCA4 no estroma, enquanto apenas a isoforma 1 foi detectada no compartimento apical de células epiteliais secretoras ao mapear a próstata anterior de ratos, indicando que neste caso em particular, o transporte transcelular de cálcio ocorre a partir do compartimento basal, em direção ao lúmen. O estudo demonstrou ainda que mediante deprivação androgênica, a localização da ATPase é alterada em células secretoras, sugerindo que a extrusão de cálcio através de PMCA pode ser modulada por andrógenos (Post, *et al.*, 2008). Por outro lado, uma investigação envolvendo linhagem celular de câncer endometrial humano mostrou que a administração de E₂ provocou uma maior transcrição dos genes que codificam TRPV6 e PMCA1 (Yang, *et al.*, 2011).

1.5 Sinalização de cálcio e carcinogênese

Os mecanismos de envelhecimento são distintos em diferentes organismos, tecidos e células. Porém, evidências suportam a teoria de que o envelhecimento é potencializado pela ação de radicais livres, particularmente por espécies reativas de oxigênio (ROS, *Reactive Oxygen Species*), uma vez que os organismos sofrem uma redução gradual de suas capacidades antioxidantes com o avançar da idade (Minelli, *et al.*, 2009; Beattie, *et al.*, 2015). As espécies reativas de oxigênio são formadas nas células de forma endógena, principalmente a partir do processo de respiração celular no interior das mitocôndrias (Minelli, *et al.*, 2009; Yan, *et al.*, 2006). A partir da sua formação, essas moléculas altamente instáveis podem interagir com componentes estruturais das células, oxidando-os e provocando a geração de mais espécies reativas de oxigênio (Minelli, *et al.*, 2009). Nesse cenário, os sistemas de controle da disponibilidade de Ca²⁺ intracelular, incluindo os transportadores transcelulares PMCA e NCX e receptores responsáveis pelo controle do armazenamento do íon no retículo endoplasmático, tais como receptores 1,4,5-inositol-trifosfato (IP3R), são particularmente susceptíveis aos efeitos de espécies reativas de oxigênio (Yan, *et al.*, 2006; Holzmann, *et al.*, 2015). Assim, processos metabólicos normais dos organismos em envelhecimento culminam em maior estresse oxidativo, geralmente acompanhado por aumento na concentração de Ca²⁺ intracelular (Yan, *et al.*, 2006; Minelli, *et al.*, 2009; Holzmann, *et al.*, 2015).

A homeostase de Ca²⁺ é essencial para o controle de processos celulares diversos, incluindo uma ampla gama de funções relevantes para os processos de tumorigênese e progressão

tumoral, tais como o controle da transcrição gênica, diferenciação, proliferação, apoptose, migração, adesão e angiogênese (Monteith, *et al.*, 2007; Dubois, *et al.*, 2014). A localização subcelular, assim como o grau e aspectos temporais de alterações na concentração intracelular basal de cálcio livre influenciam marcadamente nas vias de sinalização a serem reguladas, ampliando ainda mais o espectro de possíveis efeitos resultantes (Berridge, *et al.*, 2003). Além disso, o íon cálcio em sua forma livre apresenta grande genotoxicidade, ou seja, falhas no controle da sua disponibilidade no compartimento nuclear podem provocar instabilidade entre moléculas de DNA e proteínas associadas a ele, representando alto risco para o surgimento de mutações. Como consequência, esse ambiente instável pode favorecer o desenvolvimento de lesões teciduais, gerando desordens benignas ou malignas (Monteith, *et al.*, 2007). Considerando a importância do controle rígido da disponibilidade de Ca^{2+} intracelular para o desempenho adequado das funções celulares, torna-se necessário o estudo de suas proteínas transportadoras, tais como TRPV6, calbindina e PMCA, as quais podem afetar e/ou serem afetadas pelo processo de carcinogênese (Lee, *et al.*, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

A sinalização de Ca^{2+} intracelular é essencial para uma ampla gama de funções celulares, incluindo regulação da proliferação e morte celulares, expressão gênica, invasão e diferenciação celular. Tratando-se da fertilidade masculina, sabe-se que os fluidos secretados pela próstata e vesículas seminais, os quais irão se unir aos espermatozoides durante a ejaculação para formar o sêmen, apresentam o dobro da concentração sérica de cálcio, o que somado à alta quantidade de citrato, promove condicionamento para a sobrevivência dos gametas no ambiente ácido do trato genital feminino (Kavanagh, 1985; Blomberg Jensen, 2014). Um estudo do nosso grupo de pesquisa mostrou que o receptor nuclear de vitamina D, VDR, se encontra amplamente distribuído no complexo prostático de ratos, sendo mais expresso em animais senis, indicando que o hormônio possui participação no controle dos processos glandulares durante o envelhecimento (Campolina-Silva, *et al.*, 2018). É estabelecido na literatura o importante papel regulatório da vitamina D sobre o balanço de cálcio no organismo, tendo sido demonstrada a atuação desse hormônio como modulador da expressão e atividade de proteínas como TRPV6, calbindina e PMCA, confirmando o papel essencial destes transportadores na absorção e reabsorção de cálcio mediada pelo metabólito ativo da vitamina D (Hoenderop, *et al.*, 2005).

O processo de envelhecimento é acompanhado por alterações significativas nas vias de sinalização celular, de modo que indivíduos idosos apresentam redução nas defesas antioxidantes celulares, maior taxa de geração de estresse oxidativo, níveis mais altos de citocinas inflamatórias, e, conseqüentemente, menor resistência aos danos decorrentes de processos metabólicos normais (Minelli, *et al.*, 2009; Vaz, *et al.*, 2015). Adicionalmente, o aumento na quantidade de espécies reativas de oxigênio, geralmente acompanhado por aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular livre, representa alto risco para o surgimento de mutações gênicas e alterações estruturais e funcionais nas proteínas, o que favorece o desenvolvimento de lesões malignas ou pré-malignas mais frequentemente observadas na senescência (Minelli, *et al.*, 2009; Holzmann, *et al.*, 2015).

O câncer de próstata é a neoplasia mais prevalente entre os homens de todo o mundo e a segunda mais incidente, apenas acometendo menos indivíduos que o câncer de pulmão, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018; **Figura 12**). No Brasil, o cenário é invertido, com o câncer de próstata em primeiro lugar quanto ao número de tumores diagnosticados em 2018, e os cânceres de traqueia, brônquios e pulmão em segunda posição (INCA, 2018).

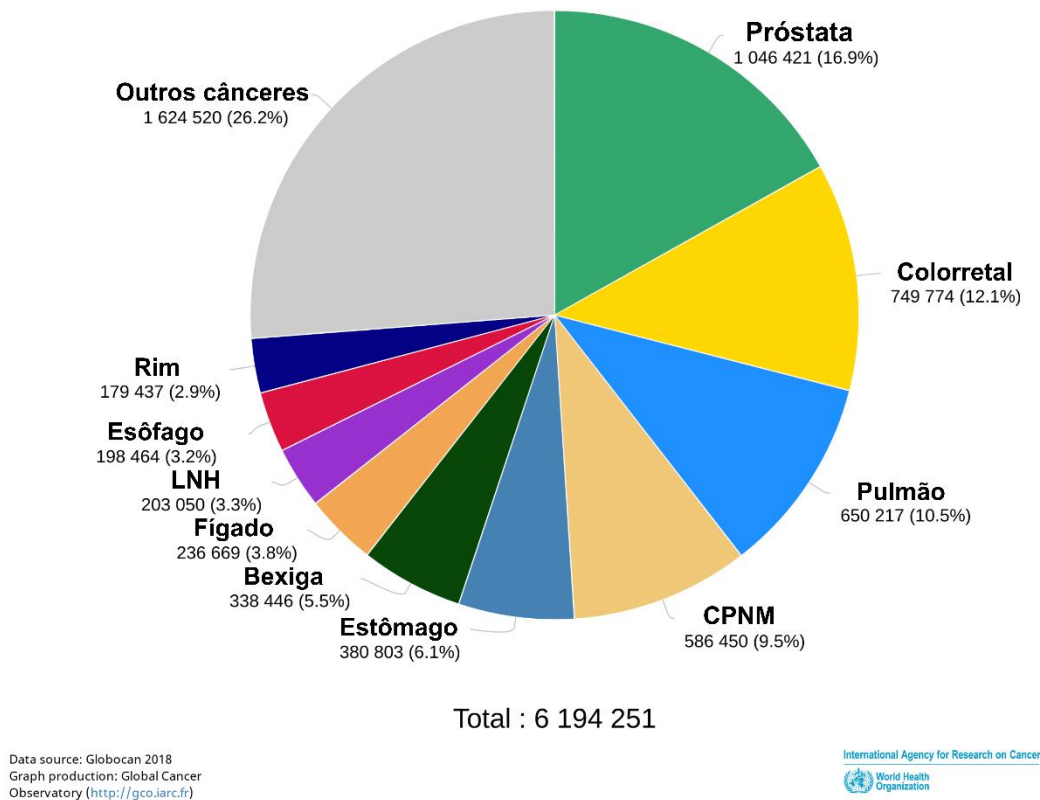


Figura 12. Prevalência estimada para diferentes cânceres em homens de todo o mundo em 2018. CPNM: câncer de pele não melanoma; LNH: linfoma não Hodgkin. Prevalência é demonstrada como número de casos e como proporção da população mundial por 100.000 pessoas. Fonte: Global Cancer Observatory, WHO (<http://gco.iarc.fr>).

Por ser alvo de desenvolvimento de um câncer tão incidente e que oferece grande impacto na qualidade de vida do portador, a próstata tem recebido grande atenção no âmbito clínico. Sabe-se que um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de tais acometimentos é o processo de envelhecimento e que a participação do íon cálcio em muitas das vias de sinalização celular envolvidas no processo de carcinogênese é indiscutível.

Tem sido demonstrada uma relevante alteração nos níveis de expressão e funcionalidade de proteínas responsáveis pelo influxo e efluxo de cálcio durante a progressão tumorigênica, resultando em menor taxa de apoptose e aumento nos processos proliferativos, de migração e adesão celular (Wolf & Wennemuth, 2014; Déliot & Constantin, 2015). Correlação entre a expressão do canal de cálcio TRPV6 e a presença de lesões malignas na próstata foi apontada por diversos estudos, os quais sugerem elevação na transcrição de seu gene de maneira correspondente ao grau de malignidade do adenocarcinoma prostático e baixos níveis ou ausência de expressão nas regiões não acometidas (Peng, *et al.*, 2001; Wissenbach, *et al.*, 2001;

Zhuang, *et al.*, 2002; Fixemer, *et al.*, 2003; Nijenhuis, *et al.*, 2003; Hoenderop, *et al.*, 2005). VanHouten e colaboradores (2010) também reportaram distúrbios no transporte transepitelial de cálcio em câncer de mama, câncer não-cutâneo mais prevalente entre as mulheres no Brasil e no mundo (INCA, 2018), tendo sido observada relação entre níveis de expressão de PMCA2, alto grau de malignidade e mau prognóstico em relação à linhagem de células utilizada.

Adicionalmente, há evidências de que CaBP desempenham importante papel na inibição de atividades pró-apoptóticas, incluindo a capacidade de calbindina de interagir com sinalizadores de morte celular (Kojetin, *et al.*, 2006). Essa atuação antiapoptótica é facilmente explicada pelo fato de que CaBP controlam a flutuação da concentração de Ca^{2+} intracelular, facilitando seu transporte e reduzindo o estresse oxidativo, uma vez que impedem o íon livre de desencadear sinais para a morte celular (Jung, *et al.*, 2011).

Considerando as evidências presentes na literatura de que, quando presente em concentrações adequadas, o íon cálcio desempenha importante papel na homeostase da glândula prostática através da atuação como mensageiro para a ativação ou inibição de inúmeras vias metabólicas e sabendo que TRPV6, calbindina e PMCA, são essenciais para o controle da disponibilidade de Ca^{2+} no ambiente intracelular, objetivou-se investigar, no presente estudo, o padrão de expressão dessas proteínas na próstata de ratos. Maior foco foi dado às alterações epiteliais benignas, pré-malignas e malignas, de forma que os resultados obtidos poderão fornecer perspectivas em relação à influência do transporte transepitelial de cálcio sobre o desenvolvimento das alterações histopatológicas frequentemente observadas na próstata de indivíduos senescentes.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho objetivou, de modo geral, a investigação acerca da expressão de proteínas importantes para o transporte transepitelial de cálcio na próstata de ratos Wistar utilizando dois modelos experimentais: a) o envelhecimento fisiológico; e b) a indução da carcinogênese pela administração de testosterona + 17β -estradiol.

Os objetivos específicos incluíram:

- Investigar e mensurar os níveis de expressão do canal de influxo TRPV6 e da bomba de extrusão de cálcio PMCA no complexo prostático em comparação a órgãos chave no transporte desse íon através de *Western blotting*;
- Mensurar os níveis de expressão de TRPV6 e PMCA nas próstatas ventral e lateral ao longo do envelhecimento através de *Western blotting*;
- Mapear a expressão celular e subcelular das proteínas TRPV6 e PMCA, assim como a proteína ligante de cálcio calbindina, no epitélio das próstatas ventral e lateral ao longo do envelhecimento através de imunohistoquímica;
- Investigar se há expressão diferenciada de TRPV6, calbindina e PMCA em sítios de alterações histopatológicas prostáticas comuns na velhice e decorrentes da indução hormonal através de imunohistoquímica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Ratos Wistar machos, obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais, foram mantidos no biotério do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em estantes climatizadas (umidade relativa de $50 \pm 10\%$; temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$), com água e ração comercial peletizada à vontade (Nuvilab CR1, Quimtia Inc.), e ciclo alternado de luz e escuro a cada 12 horas. Para o modelo de envelhecimento fisiológico, os animais foram designados aos grupos de 3, 6, 12, 18 e 24 meses de idade, de forma a abranger ratos jovens sexualmente maduros a senis. Adicionalmente, ratos Wistar de 12 meses de idade foram utilizados para o modelo de carcinogênese induzida. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA, processos 30/2016 e 344/2018).

Para a indução hormonal de câncer de próstata com a combinação testosterona + estradiol (T+E₂), ratos Wistar machos de meia-idade (12 meses; $n = 8$) foram submetidos a implante cirúrgico subcutâneo de tubos de silástica (#508-009; 1,98 mm diâmetro interno x 3,18 mm diâmetro externo; Dow-Corning Corporation, Midland, EUA), como descrito anteriormente por Bosland e colaboradores (1995). Após anestesiados por injeção de cetamina 60 mg/kg + xilazina 8 mg/kg, cada animal do grupo tratado recebeu duas cápsulas de 2,0 cm preenchidas com propionato de testosterona (#T-1875, Sigma, St. Louis, EUA), e uma de 1,0 cm, com 17- β -estradiol-3-benzoato (#E-8515, Sigma, St. Louis, EUA) na região do flanco. Animais controle ($n = 5$) foram implantados com o mesmo número de cápsulas vazias. Os animais foram devidamente acompanhados durante a recuperação pós-cirúrgica e continuamente observados quanto às condições gerais de saúde, incluindo peso corporal e alimentação. O tratamento teve duração de 6 meses, com substituição das cápsulas após 3 meses, para assegurar os níveis de liberação hormonal ao longo de todo o período (Bosland *et al.*, 1995).

4.2 Coleta e processamento de tecidos

Os tecidos biológicos utilizados para o desenvolvimento do presente trabalho foram previamente processados e se encontram devidamente armazenados em blocos de parafina ou em *ultrafreezer* no Laboratório de Biologia da Reprodução de acordo com metodologia a seguir. Os ratos foram submetidos a eutanásia ao atingir as idades de interesse ou após terminado o período de tratamento, de acordo com os grupos amostrais, por administração intraperitoneal de heparina seguida de anestésico (combinação de cetamina 60 mg/kg + xilazina 8 mg/kg). Para os estudos histopatológicos e imunohistoquímicos ($n = 5$), o sangue vascular foi removido por perfusão transcardíaca utilizando-se solução salina, seguida do fixador formalina neutra tamponada a 10%. Em seguida, a próstata foi retirada e dissecada, sendo os diferentes lobos destinados a desidratação e inclusão em parafina. Apenas próstatas laterais de animais submetidos a tratamento de T+E₂ foram utilizadas no presente trabalho, uma vez que este é o principal lobo de desenvolvimento de alterações proliferativas decorrentes do envelhecimento, sendo histologicamente homóloga à zona periférica da próstata humana e mais susceptível à indução de neoplasias (McNeal, *et al.*, 1988; Ricke *et al.*, 2008; Galheigo *et al.*, 2016; Campolina-Silva, *et al.*, 2020). Rins, duodeno, epidídimos e pele também foram coletados e processados para utilização como controles positivos dos ensaios imunohistoquímicos. Para os ensaios de *Western blotting*, ratos de diferentes idades ($n = 4$) foram perfundidos somente com solução salina e em seguida tiveram a próstata, rins, fragmentos do lobo hepático mediano e da porção proximal do duodeno retirados e dissecados, sendo imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *freezer* a -80°C.

4.3 Histopatologia

As próstatas ventrais e laterais foram submetidas a coloração de rotina por hematoxilina e eosina (H&E), para a análise histopatológica. Fragmentos de tecidos incluídos em parafina foram seccionados em cortes de 4 µm de espessura em micrótomo Microm HM 335 E (Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA), as secções de tecidos foram desparafinizadas em xilol e reidratadas por submersão em etanol em concentrações gradualmente reduzidas, seguida de água corrente. Posteriormente, os tecidos foram imersos em hematoxilina de Erlich, lavados em água corrente e corados por eosina Y aquosa a 10%. Por fim, procedeu-se a desidratação em série crescente de solução de etanol e diafanização em xilol para a montagem das lâminas e

análise ao microscópio de luz. As alterações histopatológicas encontradas foram classificadas de acordo com Shappell, *et al.* (2004), e Creasy, *et al.* (2012).

4.4 Imunohistoquímica

Fragmentos da próstata incluídos em parafina foram seccionados e submetidos a imunohistoquímica para detecção dos transportadores transepiteliais de cálcio TRPV6, calbindina e PMCA. Adicionalmente, foram realizadas imunomarcações para o receptor de vitamina D (VDR), estabelecido modulador da transcrição das proteínas-alvo deste estudo (Hoenderop, *et al.*, 2005); bem como para citoqueratina 14 (CK14), componente do citoesqueleto de células basais prostáticas (Lee, *et al.*, 2014).

Para isto, as secções foram desparafinizadas e reidratadas como descrito anteriormente, e lavadas em tampão fosfato (PBS, pH 7,4), exceto para detecção de TRPV6 na próstata ventral, quando foi utilizado tampão Tris (TBS, pH 7,4). Após bloqueio de peroxidase endógena, recuperação antigênica foi realizada por aquecimento em tampão citrato (0,01M, pH 6,0), utilizando-se micro-ondas em potência 70%. Os tecidos foram permeabilizados em metanol, juntamente com o bloqueio de peroxidase ou, alternativamente em solução de Tween 20 a 0,2% após a recuperação antigênica (**Tabela 1**). Depois, avidina e biotina endógenas foram bloqueadas utilizando-se kit comercial (Vector Laboratories, Burlingame, EUA), e realizou-se bloqueio de epítomos inespecíficos utilizando soro normal de cabra a 10%, diluído em tampão, exceto para detecção de VDR, quando foi utilizado soro normal de coelho. Subsequentemente, as secções foram incubadas em anticorpo primário diluído em tampão a aproximadamente 4°C, como descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1. Protocolo de imunohistoquímica empregado para cada proteína-alvo e anticorpos utilizados

Proteína-alvo	RA	Permeabilização	AC primário	AC secundário
TRPV6	30 minutos	Tween 20 a 0,2% (Metanol para VP)	Policlinal, #SAB2106366 (Sigma-Aldrich). IHC: 1:100, aprox. 42 horas; WB: 1:500.	Cabra anti-coelho biotilado, #E0432 (Dako) IHC: 1:200 / WB: 1:1000
PMCA	20 minutos (30 min. para VP)	Metanol (Tween 20 a 0,2% para LP T+E ₂)	Monoclonal 5F10, #MA3-914 (Thermo Fisher Sci.). IHC VP: 1:1500, aprox. 42 horas; IHC LP: 1:15.000, <i>overnight</i> ; WB: 1:1000.	Cabra anti-camundongo biotilado, #E0433 (Dako) IHC: 1:200 / WB: 1:1000
Calb	20 minutos	Metanol	Monoclonal KD-15, #7354 (Sigma-Aldrich) 1:500, <i>overnight</i> .	Cabra anti-coelho biotilado, #E0432 (Dako) 1:200
VDR	30 minutos	Metanol	Monoclonal Ab-1, 9A7γ.E10.E4, #RT-200-P1 (Thermo Fischer Sci.) 1:500, aprox. 42 horas.	Coelho anti-rato biotilado, #BA-4001 (Vector Laboratories) 1:100
CK14	20 minutos	Metanol	Monoclonal LL002, #MA5-11599 (Thermo Fischer Sci.) 1:2000, <i>overnight</i> .	Cabra anti-camundongo biotilado, #E0433 (Dako) 1:100
β-actina (WB apenas)	NA	NA	Monoclonal AC-74, #A5316 (Sigma-Aldrich) 1:5000, <i>overnight</i> .	Cabra anti-camundongo, peroxidado, #A2304 (Sigma-Aldrich) 1:5000

RA: recuperação antigênica; AC: anticorpo; IHC: imunohistoquímica; WB: Western blotting; NA: não se aplica.

Os tecidos foram então lavados em tampão e incubados por 1 hora em anticorpo secundário biotilado diluído em TBS para detecção de TRPV6 na próstata ventral, e em PBS para os demais ensaios (Tabela 1). Por fim, após lavagem, incubou-se os tecidos em complexo avidina-biotina (Vectastain Elite ABC Kit, #PK-6100, Vector Laboratories, Burlingame, EUA) em diluição 1:100. Realizou-se nova lavagem e revelação da imunomarcacão através de imersão em solução de tampão Tris HCl (0,05M e pH 7,4) contendo H₂O₂ (0,01% v/v) e 3,3'-diaminobenzidina (0,2 mg/mL). Hematoxilina de Meyer foi utilizada como contra corante e os cortes foram submetidos a desidrataçãõ em sèrie crescente de soluçãõ de etanol e diafanizados em xilol para montagem e anàlise ao microscópio de luz. Todos os fragmentos teciduais de cada *n* amostral foram processados simultaneamente para a detecção de cada proteína-alvo. Os ensaios foram realizados em duplicata, com presença de controles negativos e positivos, os quais foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos anteriormente, com substituiçãõ do anticorpo primário por tampão no caso dos controles negativos. Para os controles positivos, tecidos de animais entre 3 e 12 meses foram empregados, sendo o rim utilizado para confirmaçãõ da especificidade dos anticorpos anti-TRPV6, calbindina e VDR; epidídimo, para anti-TRPV6 e PMCA; e pele, para anti-CK14.

4.5 Imunofluorescência

Para confirmar a identidade das células epiteliais basais, foram realizados ensaios de imunofluorescência para a colocalizaçãõ do canal de cálcio TRPV6 com CK14. Secções de próstata lateral de animais controle e submetidos ao tratamento com T+E₂ foram preparadas como descrito anteriormente (seção 3.3). Após recuperaçãõ antigênica em 6 ciclos de 5 minutos, as secções foram permeabilizadas em soluçãõ de Triton X-100 (0,5% v/v) diluído em PBS e bloqueadas com soro animal como descrito na seção anterior. Em seguida, foi realizada incubaçãõ em soluçãõ contendo ambos os anticorpos primários (Tabela 1), nas diluições 1:25 e 1:3000 para TRPV6 e CK14, respectivamente. Após lavagens, procedeu-se a incubaçãõ em soluçãõ contendo anticorpos secundários fluorescentes Cabra anti-coelho Alexa Fluor 488 (#A-11008, Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA) e Cabra anti-camundongo Alexa Fluor 546 (#A-11003, Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA), diluídos 1:100 em PBS. Os ensaios foram realizados em duplicata, com presença de controles negativos e os núcleos foram observados pela marcaçãõ com 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; #D1306, Life Technology, Carlsbad, EUA). As lâminas foram montadas e as secções foram analisadas em

microscópio Axio Imager Z2-ApoTome 2 Zeiss (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), no Centro de Microscopia da UFMG, o qual possui lasers e filtros específicos para detecção da fluorescência para Alexa Fluor 488 nm (verde), Alexa Fluor 546 (laranja), ou DAPI (azul). As imagens adquiridas foram sobrepostas através do *software* NIS Elements (Nikon Instruments, Tokyo, Japão).

4.6 Extração proteica

Tecidos congelados e armazenados a -80°C foram macerados em gelo seco, de modo que os lobos prostáticos, assim como rins, duodeno e fígado de ratos de 3 meses de idade foram pesados em *pools* contendo 100 mg de tecido. Adicionalmente, as próstatas ventrais e laterais do modelo de envelhecimento fisiológico (3, 6, 12, 18 e 24 meses) foram pesadas separadamente. Após homogeneizados em 300 μL de tampão de extração – composto por Ureia (8 M), 10% de inibidores de protease (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), Tris HCl (20 mM, pH 7,5) e EDTA (0,5 mM, pH 8,0) – as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000g em temperatura de 4°C . Em seguida, a fração sobrenadante foi novamente centrifugada e o novo sobrenadante, contendo o extrato total de proteínas, foi reservado. Concentrações proteicas das amostras foram determinadas por espectrofotometria em aparelho NanoDrop Lite (Thermo Scientific, Fremont, EUA) e, quando necessário, foi adicionada água destilada estéril para que a concentração final não ultrapassasse 25 mg/mL (Bergfors, 2009). Os extratos proteicos foram então aliquotados e armazenados a -80°C .

4.7 Western blotting

Os níveis de expressão de transportadores transepiteliais de cálcio nas próstatas ventral e lateral foram avaliados ao longo do envelhecimento, assim como em comparação aos demais lobos prostáticos, rim, duodeno e fígado através da realização de ensaios de *Western blotting* em extratos proteicos totais. Assim, concentrações proteicas das amostras de interesse foram determinadas por espectrofotometria em aparelho NanoDrop Lite (Thermo Scientific, Fremont, EUA), imediatamente antes da utilização. Em seguida, 50 μg de proteínas totais foram diluídas em tampão de amostra – constituído por sódio dodecil-sulfato (1% p/v), Tris HCl (30 mM, pH

6,8), β -mercaptoetanol (10% v/v), glicerol (12% v/v) e azul de bromofenol (0,1% p/v) –, e submetidas a desnaturação em banho sônico e aquecimento a 100°C. Após realização de eletroforese contínua em gel de poliacrilamida, contendo 10% e 8% de acrilamida para TRPV6 e PMCA, respectivamente, procedeu-se transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose. Realizou-se lavagem das membranas em Tween 20 a 0,05%, bloqueio em soro normal de cabra a 10%, diluído em tampão PBS contendo albumina sérica bovina (BSA) a 1%, e incubação em solução de anticorpo primário, diluído em PBS contendo BSA a 1%, *overnight* a 4°C, como indicado na Tabela 1. Terminada a incubação, a membrana foi imersa em solução de anticorpo secundário biotilado, diluído em BSA a 1%, e em complexo avidina-biotina (Vectastain Elite ABC Kit #PK-4000, Vector Laboratories, Burlingame, EUA). As bandas proteicas foram visualizadas através da reação do complexo amplificador avidina-biotina com solução contendo 3,3'-diaminobenzidina (0,1% p/v), cloronaftol (0,05% p/v), metanol (9% v/v) e H₂O₂ (0,04% v/v). Cada ensaio foi realizado em triplicata, utilizando-se expressão da proteína estrutural β -actina como controle interno de cada membrana de nitrocelulose (Tabela 1).

4.8 Índices quantitativos de imunomarcção

Análise dos níveis totais de proteína expressos na próstata ventral de ratos em diferentes idades foi realizada através de estudo densitométrico das bandas obtidas pelos ensaios de *Western blotting*. Para isso, as membranas de nitrocelulose foram escaneadas e as bandas positivas para cada proteína-alvo foram analisadas com o auxílio da ferramenta “géis” do *software* Image J (NIH, EUA). Para cada banda positiva, correspondente a uma amostra aplicada em gel de eletroforese, foi gerado um pico de densidade, cuja área foi quantificada. Determinou-se o valor percentual de cada pico em relação à somatória dos picos do *n* amostral (Taylor, *et al.*, 2013). O valor percentual de cada banda foi então dividido pelo valor percentual da banda correspondente para a proteína constitutiva β -actina. Assim, os níveis de expressão de cada proteína avaliada foram graficamente representados como expressão relativa em unidade arbitrária (UA).

A fim de determinar a significância de alterações detectadas nos ensaios imunohistoquímicos, realizou-se análises quantitativas relativas à positividade de células epiteliais prostáticas. Dessa forma, as lâminas utilizadas para realização de preparos imunohistoquímicos foram digitalizadas utilizando *scanner* de lâminas automático Pannoramic MIDI II (3DHISTECH, Budapeste, HU). Adenômeros de próstatas ventrais e laterais de diferentes idades, foram

capturados em aumento de 40x utilizando o *software* PanoramicViewer (3DHISTECH, Budapeste, HU). Utilizando adaptação do protocolo descrito por Campolina-Silva e colaboradores (2018), 4 imagens de adenômeros distais foram capturadas das próstatas ventral e lateral de animais idosos, assim como da próstata lateral de animais tratados com a combinação T+E₂, nos quais observou-se a presença de alterações como atrofia, hiperplasia, metaplasia escamosa, PIA e PIN. Células epiteliais positivas e negativas para TRPV6, assim como células basais intensamente coradas para TRPV6 foram contadas em todas as imagens adquiridas, a fim de se obter a porcentagem de tais fenótipos ao longo do envelhecimento (Campolina-Silva, *et al.*, 2018). Os valores obtidos também foram utilizados para a detecção de possíveis diferenças entre células de lesões prostáticas em comparação ao epitélio normal adjacente.

4.9 Análises estatísticas

Os dados numéricos obtidos a partir das análises quantitativas e semiquantitativas foram submetidos a análises estatísticas utilizando o *software* GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, EUA), de acordo com sua distribuição de valores, a qual foi determinada pelo teste Shapiro-Wilk. Os conjuntos que assumiram distribuição normal foram analisados pelo teste paramétrico t-Student, quando foram necessárias análises entre dois grupos, ou pelo teste ANOVA de um fator seguido do pós-teste Tukey para comparações múltiplas entre as médias de três ou mais grupos. Caso contrário, os dados com distribuição não-paramétrica foram analisados pelo teste Mann-Whitney, ou utilizando Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste Dunns, para dois ou mais grupos, respectivamente. Para análises de lesões prostáticas *versus* epitélio inalterado, os dados foram submetidos a testes pareados. Resultados foram apresentados graficamente como média \pm erro padrão da média (SEM), de modo que as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão de TRPV6 e PMCA em tecidos-alvo

Visando elucidar a participação do canal de influxo TRPV6 e da bomba de extrusão PMCA na manutenção da homeostase de Ca^{2+} no complexo prostático de ratos Wistar, a expressão desses transportadores foi determinada e seus níveis foram mensurados em extratos proteicos totais da próstata de animais jovens sexualmente maduros (3 meses de idade). Extratos proteicos totais dos rins, duodeno e fígado destes mesmos animais também foram avaliados.

A partir das amostras teciduais, ensaios de *Western blotting* para TRPV6 revelaram a presença de banda principal de aproximadamente 83 kDa. Anticorpo primário anti-TRPV6 também interagiu com banda proteica de aproximadamente 75 kDa nas amostras de rim e fígado. PMCA, por sua vez, foi detectada em banda de aproximadamente 127 kDa.

Dentre os órgãos analisados, a maior expressão de TRPV6 foi observada no fígado ($p \leq 0,0043$), seguido dos lobos ventral e lateral da próstata ($p \leq 0,012$). Os lobos prostáticos dorsal e anterior tiveram os menores níveis de expressão, com imunorreação comparável à dos rins e duodeno. Similarmente, PMCA também teve os maiores níveis de expressão no fígado ($p \leq 0,005$), seguido pelo rim ($p \leq 0,018$), próstata ventral ($p \leq 0,002$) e próstata lateral ($p \leq 0,015$). Por outro lado, a positividade para PMCA em amostras de próstata dorsal, próstata lateral e duodeno foi indetectável nas condições experimentais aqui empregadas (**Figura 13**).

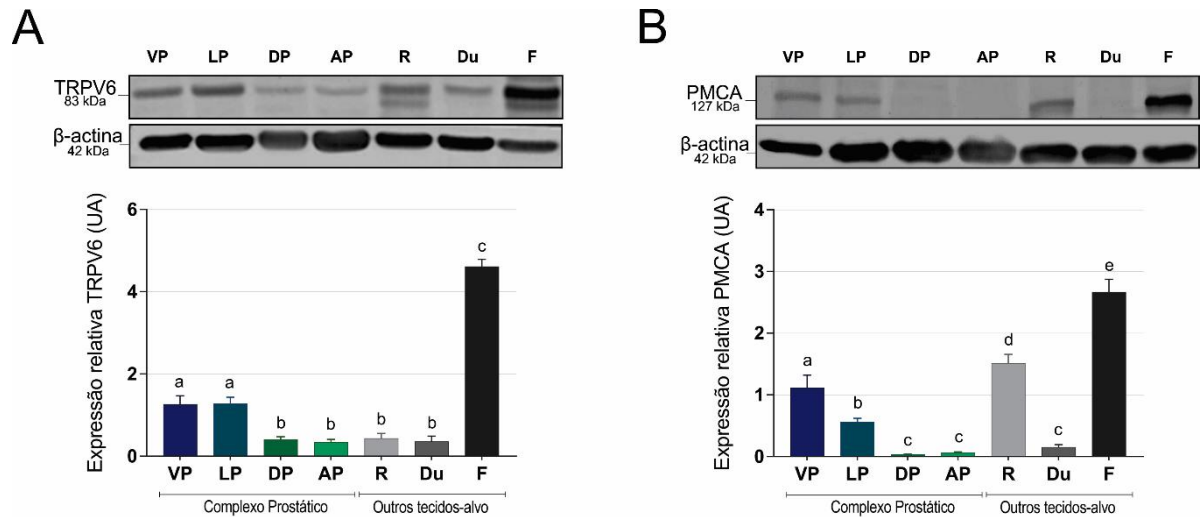


Figura 13. Nível de expressão de TRPV6 (A) e PMCA (B) no complexo prostático, rim, duodeno e fígado de ratos Wistar. VP: próstata ventral; LP: próstata lateral; DP: próstata dorsal; AP: próstata anterior; R: rim; Du: duodeno; F: fígado. Os resultados foram demonstrados em unidade arbitrária (UA) como média \pm SEM para a expressão de cada proteína-alvo normalizada pelo controle interno (β -actina). As figuras são representativas de 3 ensaios independentes. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($n = 4$; $P \leq 0,05$).

Dentre o complexo prostático, as próstatas ventral e lateral foram elegidas para as investigações descritas adiante. Dessa forma, ratos Wistar sexualmente maduros de 3 a 24 meses de idade foram avaliados quanto à expressão prostática de TRPV6 e PMCA. Animais jovens de 3 meses de idade apresentaram os maiores níveis de expressão de TRPV6 na próstata ventral em comparação às demais idades ($p \leq 0,02$). A imunomarcagem para essa proteína não sofreu variação nas próstatas ventrais de ratos entre 6 e 24 meses. Em contraste, próstatas laterais de animais em idade mais avançada (24 meses) foram as que apresentaram maior expressão desse canal de Ca^{2+} em comparação ao grupo de 3 meses ($p = 0,039$; **Figura 14A**).

Por outro lado, PMCA foi menos expressa nas próstatas ventrais de animais idosos em comparação aos jovens, apresentando redução significativa a partir dos 18 meses de idade, em relação ao grupo de 3 meses ($p = 0,028$). Similarmente, próstatas laterais de ratos aos 18 e 24 meses também apresentaram menor expressão da ATPase, quando comparadas às de animais jovens ($p \leq 0,028$), com maior positividade detectada aos 3 meses de idade ($p \leq 0,0036$) (**Figura 14B**).

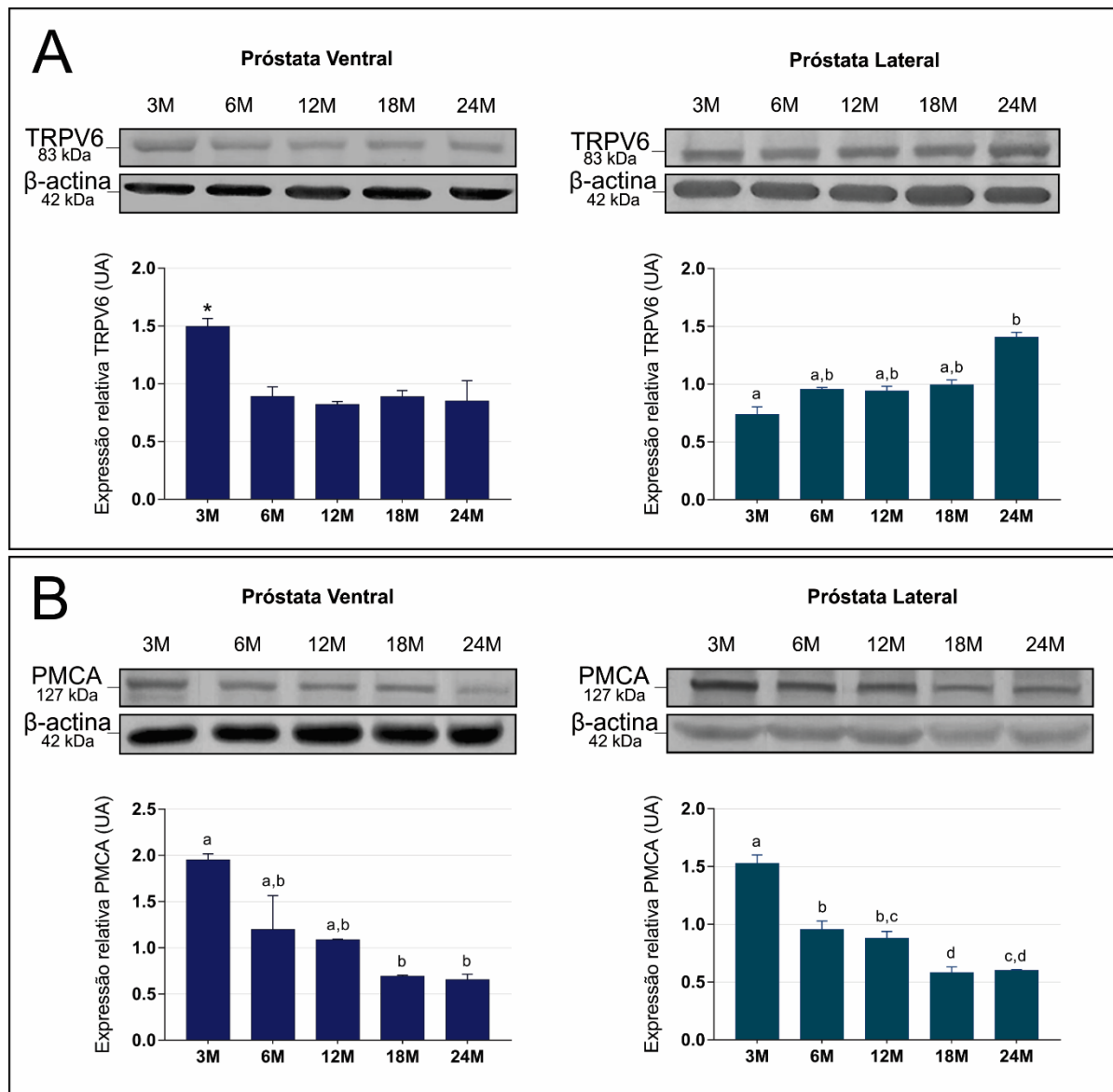


Figura 14. Nível de expressão de TRPV6 (A) e PMCA (B) na próstata ventral e lateral de ratos Wistar em diferentes idades. Os resultados foram demonstrados em unidade arbitrária (UA) como média \pm SEM para a expressão de cada proteína-alvo, normalizada pelo controle interno (β -actina). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. * $p \leq 0,05$. As figuras são representativas de 3 ensaios independentes ($n = 3$).

5.2 Imunolocalização de TRPV6 na próstata saudável e alterada

Uma vez que TRPV6 foi consideravelmente expresso pelas próstatas ventral e lateral de ratos Wistar em todas as idades avaliadas, ensaios imunohistoquímicos foram realizados para determinar sua localização no compartimento epitelial prostático. Destaca-se que células neuroendócrinas não foram investigadas no presente trabalho, de modo que as células epiteliais

de morfologia colunar serão tratadas aqui como células luminais, enquanto células basais foram assim denominadas mediante identificação pelo marcador molecular CK14.

TRPV6 foi observado distribuído pelo citoplasma de células luminais de ambos os lobos prostáticos analisados (**Figura 15A**). Ocasionalmente, notou-se a presença de células luminais negativas ou, raramente, outras com maior intensidade de imunorreação em relação às suas vizinhas (**Figura 15B,C**). Células TRPV6-negativas corresponderam a $0,46 \pm 0,86\%$ das células epiteliais de animais jovens (3 e 6 meses), na próstata ventral; e a $1,51 \pm 1,17\%$ na próstata lateral, não havendo alteração significativa na porcentagem de células negativas ao longo do envelhecimento (**Figura 15E**). As células luminais mais intensamente positivas para TRPV6 não foram encontradas em frequência suficiente para a sua contabilização.

No presente estudo, as porções glandulares de ambos os lobos prostáticos avaliados aparentaram maior intensidade de imunorreação para TRPV6, em comparação a regiões proximais morfologicamente compatíveis com ductos prostáticos (**Figura 15D**). Ainda, algumas células presentes no compartimento basal do epitélio prostático, as quais frequentemente apresentaram delgados prolongamentos citoplasmáticos localizados entre ou sob células epiteliais luminais, mostraram intensa positividade para TRPV6 (**Figura 15F**). Tais células intensamente positivas tiveram sua identidade confirmada através de colocalização com o marcador molecular de células basais (cb), CK14, sendo denominadas cb-TRPV6⁺⁺ nesse trabalho, para fins de simplificação. Além das cb-TRPV6⁺⁺, registrou-se a presença de células CK14⁺ com expressão de TRPV6 em intensidade similar à notada para células luminais (**Figura 16D,E**).

Em média, 10,49% de todas as células epiteliais prostáticas de ratos Wistar jovens (3 e 6 meses) foram CK14-positivas (dados não mostrados). As cb-TRPV6⁺⁺ foram encontradas ao longo de todo o epitélio prostático de ambos os lobos, correspondendo, em animais jovens (3 e 6 meses), a $0,51 \pm 0,16\%$ das células epiteliais na próstata ventral e a $0,16 \pm 0,09\%$, na próstata lateral. Análise quantitativa revelou porcentagem de cb-TRPV6⁺⁺ estatisticamente similar independentemente da idade, tendo sido observada uma elevada variação interamostral entre animais senis (**Figura 15F**). Assim, nas próstatas ventrais de ratos aos 12 e 24 meses de idade, a porcentagem mínima obtida para cb-TRPV6⁺⁺ foi de 0%, atingindo até 3,79% ou 8,05%, respectivamente. Por outro lado, grandes flutuações foram encontradas entre próstatas laterais de ratos aos 12 e 18 meses, que apresentaram de 0% a 1,63% ou 1,35% de cb-TRPV6⁺⁺ em seus epitélios, respectivamente (**Figura 15F**).

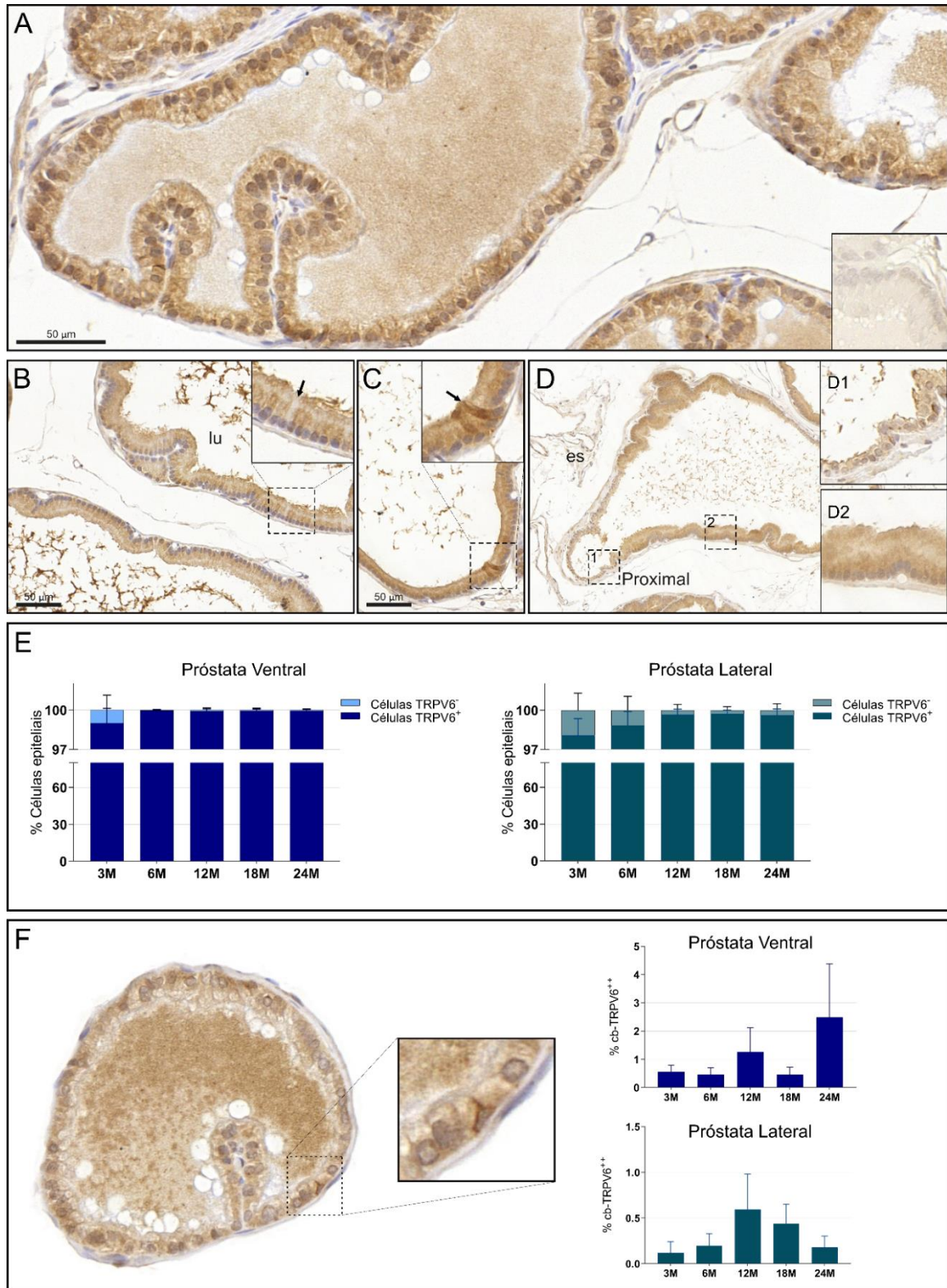


Figura 15. Localização de TRPV6 no epitélio normal das próstatas ventral e lateral de ratos Wistar em diferentes idades. (A) TRPV6 foi detectado no citoplasma de células epiteliais (inserto: controle negativo). (B) Esporádicas células luminais foram negativas para TRPV6 (seta). (C) Rara célula luminal intensamente marcada para TRPV6 (seta). (D) Ducto da VP com imunomarcção menos intensa para TRPV6 (D1), em relação às regiões glandulares (D2). (E) Porcentagem de células epiteliais positivas e negativas para TRPV6 ao longo do envelhecimento. (F) Esporádicas células similares a basais tiveram intensa positividade para TRPV6 (inserto), sendo a sua frequência em diferentes idades demonstrada graficamente. lu: lúmen; es: componentes do estroma. As figuras são representativas de 3 ensaios independentes ($n = 5$).

O processo de envelhecimento foi acompanhado pelo surgimento de alterações histopatológicas pontuais em ambos os lobos prostáticos de ratos Wistar, sendo observadas hiperplasia e atrofia em todos os animais a partir dos 12 meses de idade. LGPIN foi detectada em 90,9% dos ratos aos 18 meses e HGPIN, em 63,6% desses animais, sendo que a arquitetura ondulada da lesão foi predominante nas próstatas ventral e lateral, com a detecção de uma única HGPIN cribriforme em rato de 24 meses. As lesões metaplasia escamosa e PIA foram observadas exclusivamente na próstata lateral, com incidência de 27,3% e 36,4%, respectivamente. Por fim, lesões compatíveis com câncer foram incidentes em 36,4% dos animais aos 18 meses de idade. Com o objetivo de ampliar a incidência e severidade de tais lesões espontâneas, empregou-se a indução hormonal da carcinogênese através de tratamento crônico com T+E₂ (**Tabela 2**). O tratamento não interferiu na incidência de focos epiteliais de hiperplasia, atrofia, LGPIN e metaplasia escamosa, mas aumentou significativamente a porcentagem de animais que apresentaram lesões de PIA (91,7%), HGPIN (100%) e adenocarcinoma prostático (100%). Os dados acima apresentados foram publicados em artigo científico (Campolina-Silva, *et al.*, 2020).

Tabela 2. Incidência de lesões epiteliais prostáticas na próstata de ratos Wistar aos 18 meses de idade

Lesão epitelial	Controle	T+E ₂	<i>p</i> valor
Hiperplasia	100%	100%	> 0,999
Atrofia	100%	100%	> 0,999
Metaplasia escamosa (apenas LP)	27,3%	41,7%	0,667
PIA (apenas LP)	36,4%	91,7%	0,009*
LGPIN	90,9%	100%	0,478
HGPIN	63,6%	100%	0,037*
Adenocarcinoma	36,4%	100%	0,001*

LP: *próstata lateral*. * $p \leq 0,05$

TRPV6 foi homogeneamente distribuído pelo citoplasma de células luminiais de todo o epitélio glandular de ambos os lobos prostáticos, independentemente da presença de alterações histopatológicas, sejam elas benignas, pré-malignas ou malignas. Todavia, enfatiza-se a detecção de elevada positividade para TRPV6 em lesões caracterizadas por enriquecimento de células basais, tais como metaplasia escamosa e PIA, uma vez que essas lesões também apresentaram maior abundância de cb-TRPV6⁺⁺ (**Figura 16 e 17**). Em ensaios de imunofluorescência com a colocalização de TRPV6 e CK14, observou-se que metaplasias escamosas e PIA apresentaram a maior parte das células CK14⁺ intensamente marcadas para

TRPV6, embora em algumas células basais, essa expressão mais elevada não esteve presente (Figura 16D,E).

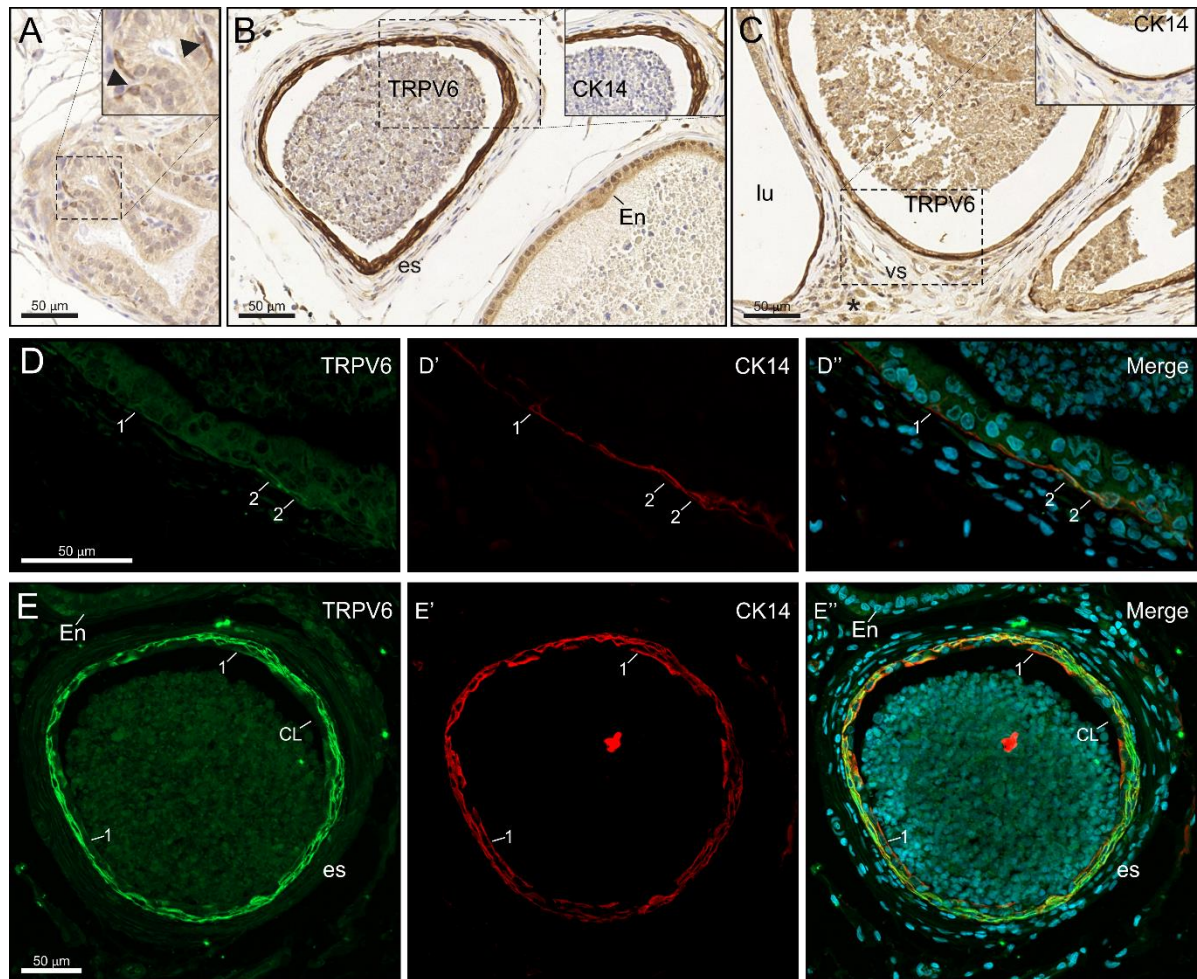


Figura 16. TRPV6 é mais expresso por células basais CK14-positivas em diferentes lesões da próstata lateral de ratos Wistar. (A) Células basais frequentemente apresentaram intensa positividade para TRPV6 (cabeças-de-seta). Metaplasia escamosa (B) e PIA (C), apresentam maior população de cb-TRPV6⁺⁺, como mostrado em secções sequenciais marcadas para CK14 (insetos). Observam-se células basais positivas, expressando TRPV6 em níveis comparáveis aos de células luminais (1), assim como outras mais intensamente marcadas (2) em LGPIN (D), e metaplasia escamosa (E). Merge: positividade para TRPV6 (verde), CK14 (vermelho) e DAPI (azul claro) combinadas. As figuras são representativas de 3 ensaios independentes. es: componentes do estroma; En: epitélio normal lu: lúmen; vs: vaso sanguíneo; asterisco: infiltrado inflamatório; CL: célula epitelial luminal.

Nesse sentido, as lesões de próstatas laterais de ratos Wistar a partir dos 12 meses, assim como de ratos submetidos a tratamento com T+E₂ foram quantitativamente avaliadas quanto à abundância de cb-TRPV6⁺⁺ (Figura 17). Observou-se que essa subpopulação de células basais foi cerca de 2,88 vezes mais numerosa no epitélio inalterado de animais tratados, em relação aos controle ($3,05 \pm 0,76\%$ versus $1,06 \pm 0,39\%$, respectivamente; $p = 0,019$. Figura 17).

As análises estatísticas pareadas mostraram maior frequência de cb-TRPV6⁺⁺ em metaplasias escamosas e PIA ($p = 0,0001$), revelando ainda ausência dessas células em atrofia epitelial (p

= 0,031). Não foram observadas diferenças estatísticas entre a quantidade de cb-TRPV6⁺⁺ encontradas em hiperplasias e PIN, e seus respectivos epitélios inalterados adjacentes (**Figura 17**).

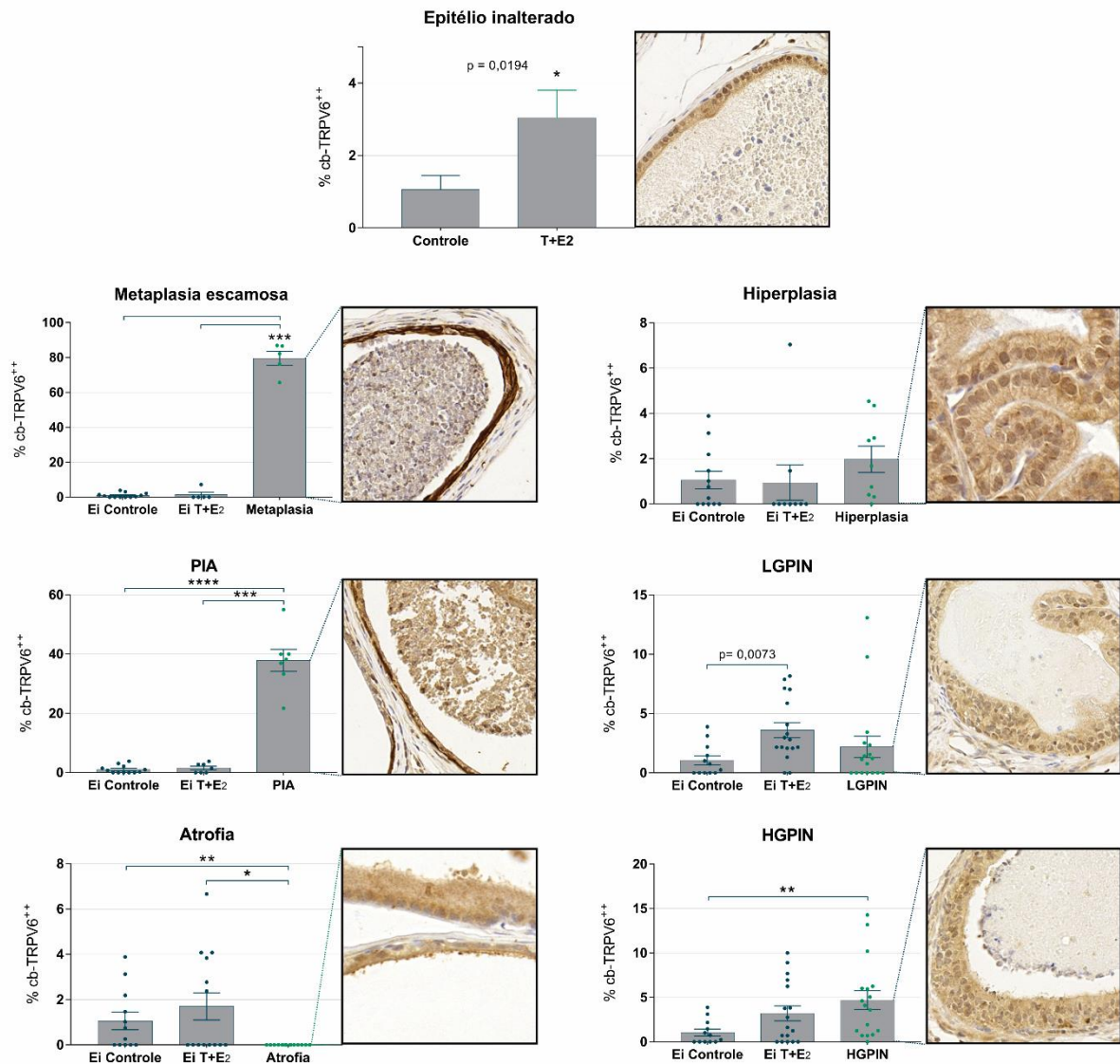


Figura 17. Frequência de células basais intensamente marcadas para TRPV6 em lesões da próstata lateral de ratos Wistar. Tratamento crônico com T+E₂ provocou aumento da porcentagem de cb-TRPV6⁺⁺ nos epitélios inalterados da LP, de modo que cada lesão prostática também foi comparada ao epitélio inalterado adjacente. Ei: epitélio inalterado. As figuras são representativas de 3 ensaios independentes. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0005$; **** $p < 0,0001$.

Quanto às lesões malignas, houve detecção de adenocarcinoma prostático em 6 ratos dentre os 25 animais submetidos ao envelhecimento fisiológico e avaliados no presente trabalho, incluindo um caso raro na próstata ventral de animal jovem de 6 meses de idade. Em

contrapartida, dentre os 8 animais submetidos a tratamento com T+E₂, observou-se 100% de prevalência de lesões malignas, com a sobrevivência de 7 ratos até os 18 meses de idade.

Os adenocarcinomas prostáticos foram identificados pela desorganização da arquitetura pseudoestratificada normal da próstata, acompanhada da presença de células atípicas, figuras de mitose, frequentes núcleos aberrantes e nucléolos proeminentes, visualizados em preparos histológicos corados com H&E. As células epiteliais transformadas ocasionalmente formaram pequenas estruturas glandulares, caracterizando adenocarcinomas microacinares ou bem diferenciados. Esses microacinos foram observados dentro dos limites da glândula, sendo nitidamente circundados por uma membrana basal intacta, ou se apresentaram como estruturas invasivas com crescimento em direção ao estroma adjacente (**Figura 18**). Alternativamente, foram observadas células atípicas de morfologia similar à de células mesenquimatosas, infiltradas entre os componentes do estroma e caracterizando assim carcinoma invasivo pouco diferenciado. Os adenocarcinomas prostáticos foram geralmente associados a espessamento do estroma periacinar e presença de infiltrado inflamatório em suas adjacências. Apresentaram também, frequentes células fracamente coradas para o receptor de vitamina D. Uma vez que o presente trabalho objetivou a investigação de proteínas envolvidas no transporte de cálcio através do tecido epitelial, lesões invasivas pouco diferenciadas não foram molecularmente caracterizadas ou abordadas quanto à expressão dos transportadores-alvo.

Assim, regiões de adenocarcinoma bem diferenciado foram avaliadas quanto à presença de cb-TRPV6⁺⁺. Essas células basais intensamente positivas não foram encontradas em neoplasias de 8 dos 13 animais que apresentaram algum tipo de câncer (61,54%)(**Figura 18A**). Por outro lado, 5 dos 13 ratos com focos de neoplasia (38,46%), todos pertencentes ao modelo de envelhecimento fisiológico, apresentaram lesões malignas com presença de células basais CK14⁺ e intensamente marcadas para TRPV6 (**Figura 18B**). As lesões neoplásicas aqui descritas se apresentaram tanto como carcinomas bem diferenciados não-invasivos ou invasivos e apresentaram, ainda, padrões de crescimento celular variando desde a organização microacinar clássica e a formação de grandes massas tumorais compactas, até pequenos grupos de células isoladamente localizados entre os componentes do estroma. Por essa razão, não foi possível traçar critérios para a determinação da frequência de cb-TRPV6⁺⁺ que pudessem ser aplicados a todos os sítios de adenocarcinoma encontrados.

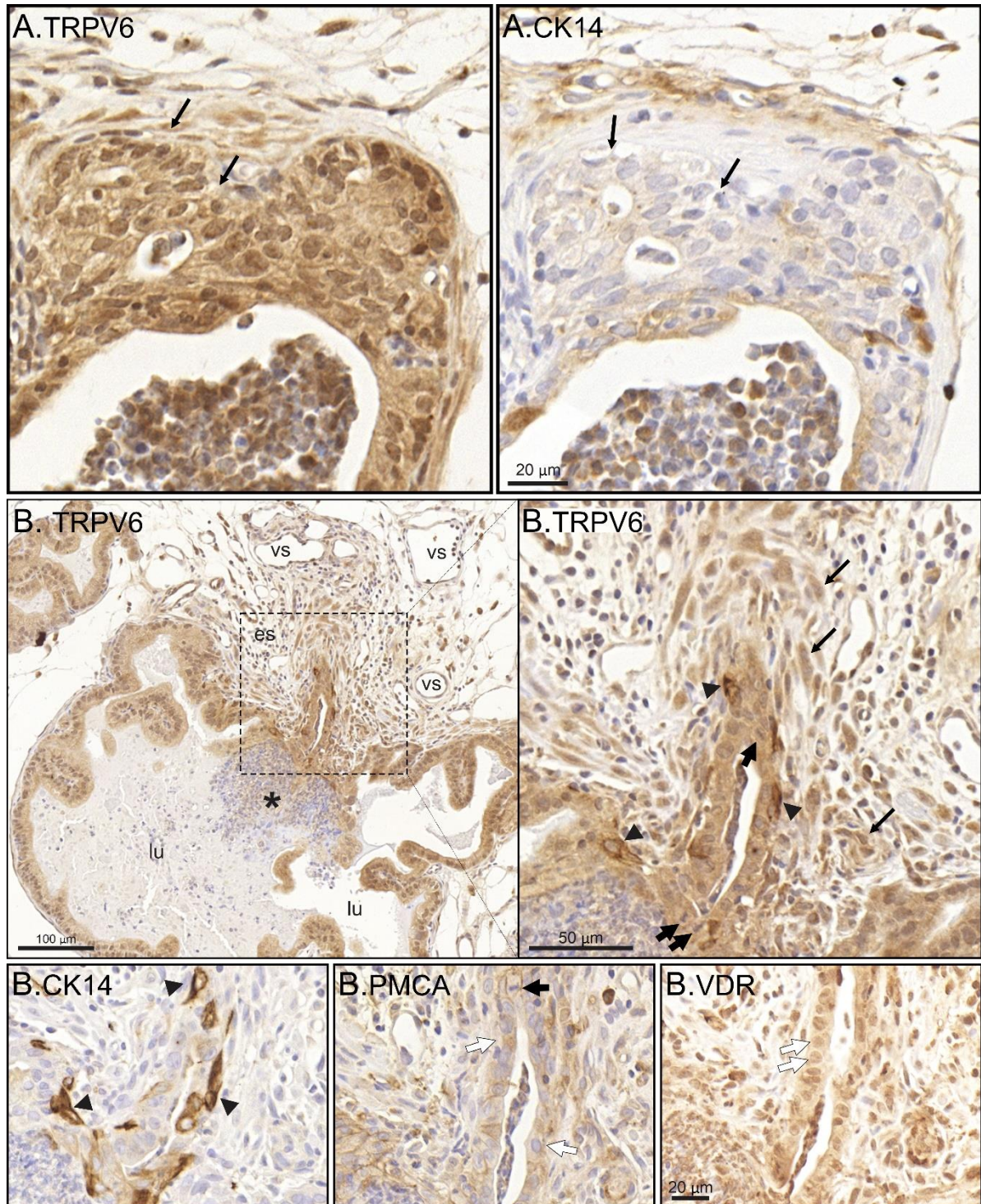


Figura 18. Localização de TRPV6 em adenocarcinoma bem diferenciado da próstata de ratos Wistar. (A) Secção da LP de rato tratado com T+E₂, mostrando a formação de dois microcânions (setas), os quais contém células atípicas e expressão uniforme de TRPV6 (A.TRPV6). Não houve detecção de células basais (A.CK14). (B) Adenocarcinoma bem diferenciado associado a volumoso infiltrado inflamatório (LP, 24 meses), no qual observa-se crescimento epitelial e invasão de células neoplásicas no estroma adjacente (setas longas). Figuras de mitose estão presentes (setas curtas) e há neoformação de vasos sanguíneos (vs). TRPV6 foi uniformemente distribuído entre células luminiais e intensamente expresso por algumas células basais (cabeças-de-seta; B.CK14). A bomba de extrusão de Ca²⁺ PMCA e o fator de transcrição envolvido no controle da expressão de transportadores transepteliais de Ca²⁺ VDR, tiveram sua expressão reduzida em células neoplásicas (setas brancas). lu: lúmen; En: epitélio normal; es: componentes do estroma. As figuras são representativas de 3 ensaios independentes.

5.3 Imunolocalização de PMCA na próstata saudável e alterada

Células epiteliais luminais e basais de ambos os lobos prostáticos de ratos Wistar expressaram a bomba de extrusão de Ca^{2+} PMCA principalmente no domínio basolateral de suas membranas plasmáticas, sendo detectada também positividade citoplasmática mais fraca (**Figura 19A,B**). Particularmente na próstata lateral, em alguns casos, a imunorreatividade para essa ATPase aparentou ser mais intensa em regiões mais distais do epitélio glandular, quando comparadas às suas regiões de ductos proximais correspondentes (**Figura 19A**).

Tratando-se das alterações histopatológicas oriundas do processo de envelhecimento e induzidas pelo tratamento crônico com T+E₂, observou-se menor positividade para PMCA em células epiteliais atróficas (**Figura 19C**). Lesões proliferativas, tais como, metaplasia escamosa, PIA e PIN, também apresentaram menor expressão, quando comparadas ao epitélio inalterado adjacente (**Figura 19D,E e 20**). Registrou-se a ocorrência de HGPIN de arquitetura cribriforme na próstata ventral de um único rato de 24 meses de idade dentre todos os animais avaliados. Nesse caso, a expressão de PMCA foi reduzida principalmente em regiões centrais da lesão, sendo mantida em algumas células localizadas na periferia, incluindo células em divisão (**Figura 19**). HGPIN cribriforme foi composto exclusivamente por células luminais e apresentou expressão intermitente de receptor de vitamina D. PMCA também sofreu redução em sua positividade em sítios de adenocarcinoma prostático, em comparação ao epitélio inalterado adjacente (**Figura 22**).

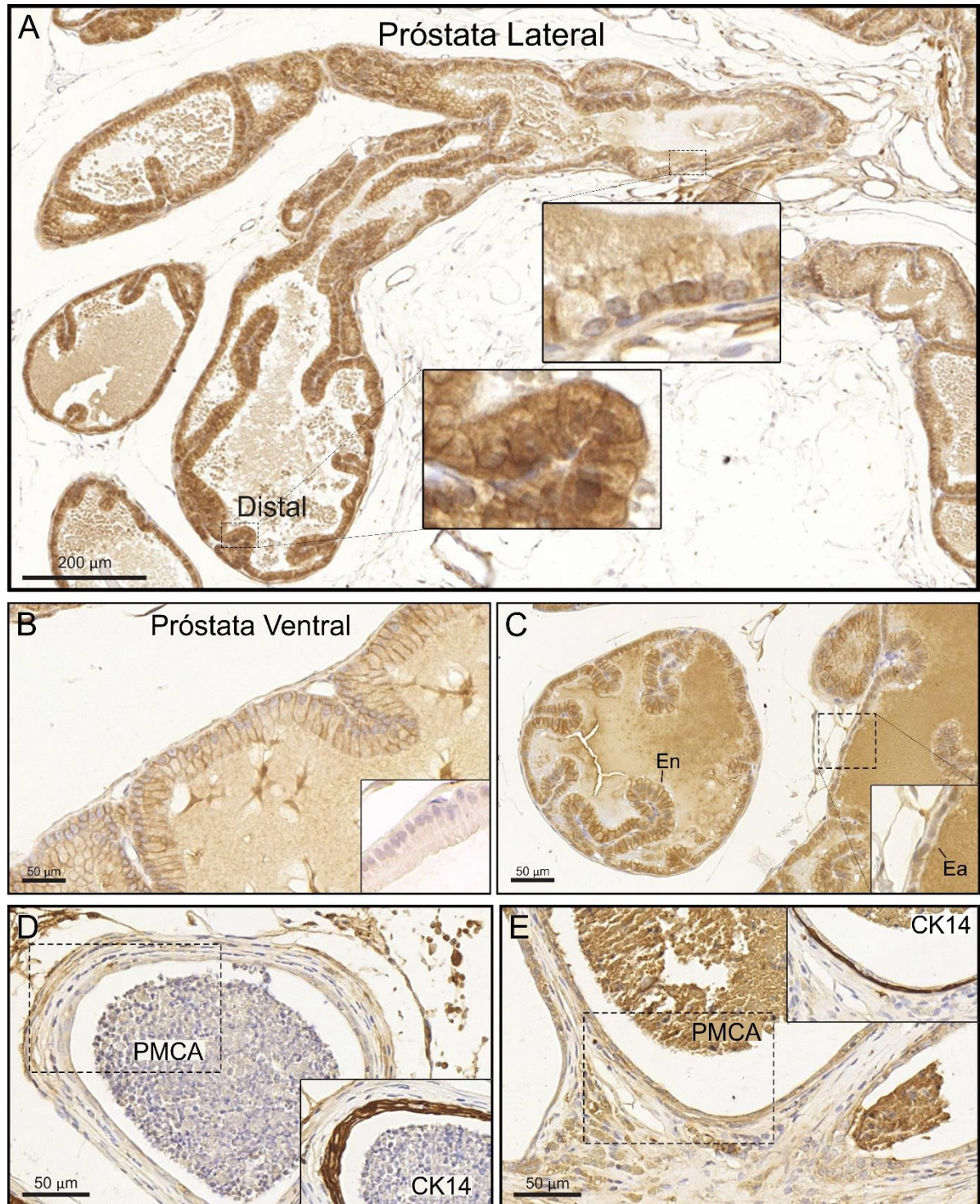


Figura 19. Localização de PMCA no epitélio normal e alterado das próstatas ventral e lateral de ratos Wistar. PMCA foi detectada principalmente nas membranas plasmáticas basolaterais de células epiteliais da LP (A) e VP (B; inserto: controle negativo). (A) Algumas LP apresentaram intensidade de imunomarcagem aparentemente maior nas regiões glandulares mais distais, em relação ao epitélio proximal correspondente. (C) Observou-se menor intensidade de imunomarcagem para PMCA em atrofia simples, assim como drástica redução em metaplasia escamosa (D) e PIA (E). lu: lúmen; En: epitélio normal; Ea: epitélio atrófico. As figuras são representativas de 3 ensaios independentes.

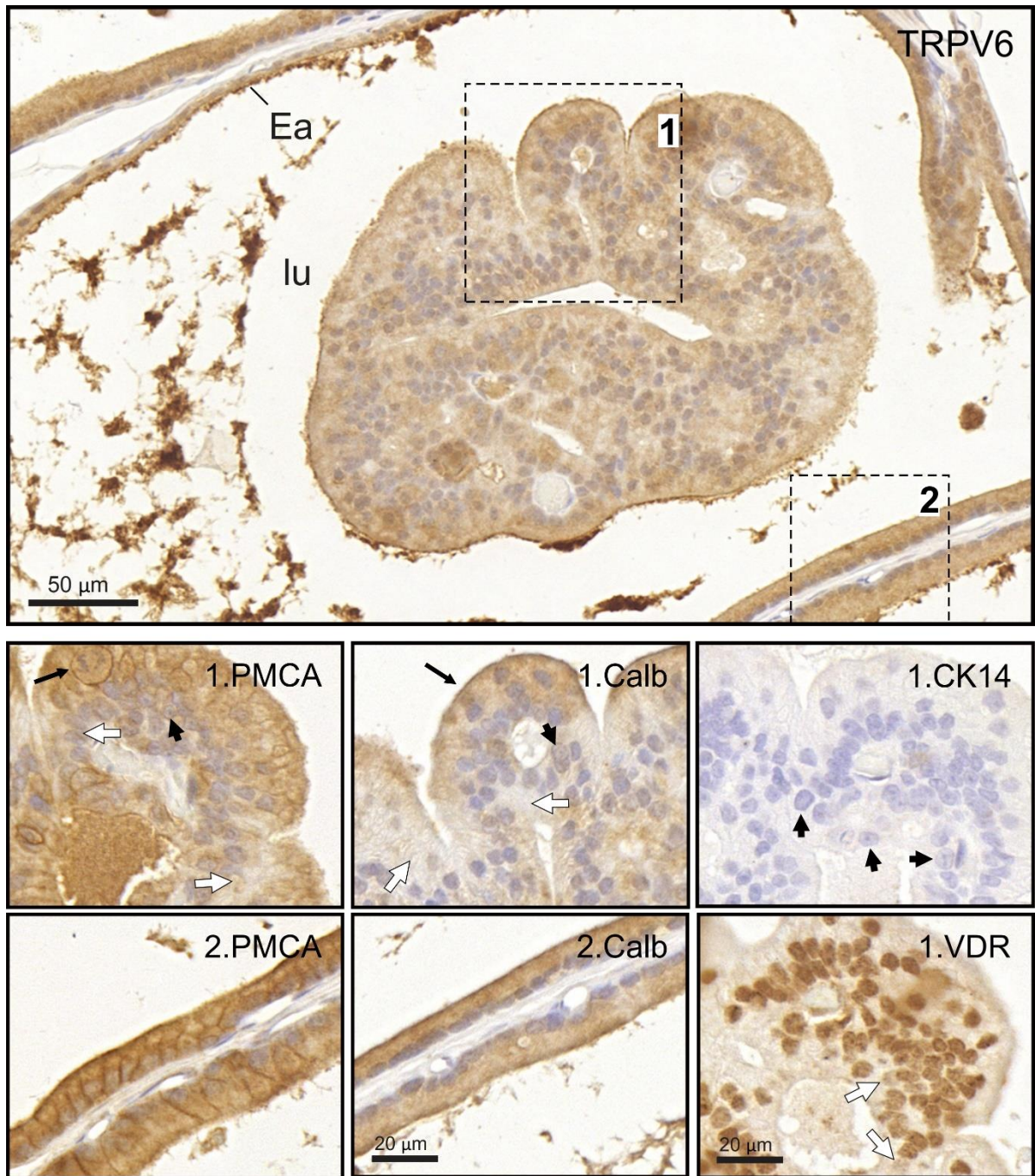


Figura 20. Localização de TRPV6, PMCA e calbindina em HGPIN de arquitetura cribriforme da próstata ventral de rato Wistar. HGPIN (VP, 24 meses), contendo células com frequentes nucléolos proeminentes (setas pretas curtas); observa-se expressão inalterada de TRPV6 e reduzida expressão de PMCA, calb e VDR (1; setas brancas), em relação ao epitélio normal adjacente (2). Esta lesão é caracterizada pela ausência de células basais CK14-positivas. Regiões periféricas são positivas para calb e PMCA em níveis similares aos normais (setas pretas longas). Uma célula em divisão positiva para PMCA pôde ser observada (seta preta longa). En: epitélio normal; Ea: epitélio atrófico; lu: lúmen. As figuras são representativas de 3 ensaios independentes.

5.4 Imunolocalização de calbindina na próstata saudável e alterada

Com o objetivo de elucidar a participação, na próstata, de proteínas envolvidas em cada uma das etapas que constituem o transporte transepitelial de cálcio, calbindina foi selecionada como componente adicional para investigação no presente trabalho. Ampla distribuição de calbindina foi observada nos epitélios normais de ambos os lobos prostáticos avaliados, sendo a imunorreação notada primariamente no citoplasma de células epiteliais luminiais e basais (**Figura 21A,B**). Não foram detectadas diferenças marcantes na positividade para calbindina entre os adenômeros prostáticos distais e as regiões de ductos proximais correspondentes.

Por outro lado, dentre as lesões prostáticas benignas e pré-malignas encontradas na próstata de ratos idosos e submetidos a tratamento com T+E₂, calbindina se mostrou menos expressa apenas em PIN, sendo observadas algumas células mais fracamente positivas para a ligante de Ca²⁺ (**Figura 21C**) em HGPIN plano. No caso de HGPIN com arquitetura cribriforme, sua expressão foi restrita a pequenas porções periféricas da lesão (Figura 20). Sítios de adenocarcinoma prostático também apresentaram mais frequentemente células com fraca positividade para essa ligante de cálcio, em contraste à intensa imunorreação notada em epitélios inalterados adjacentes (**Figura 22**). Outras alterações histopatológicas benignas, tais como atrofia, ou proliferativas, como hiperplasia, metaplasia escamosa e PIA, aparentaram não ter níveis de expressão de calbindina alterados na maioria dos tecidos avaliados, quando comparados ao epitélio inalterado adjacente (**Figura 21D,E**).

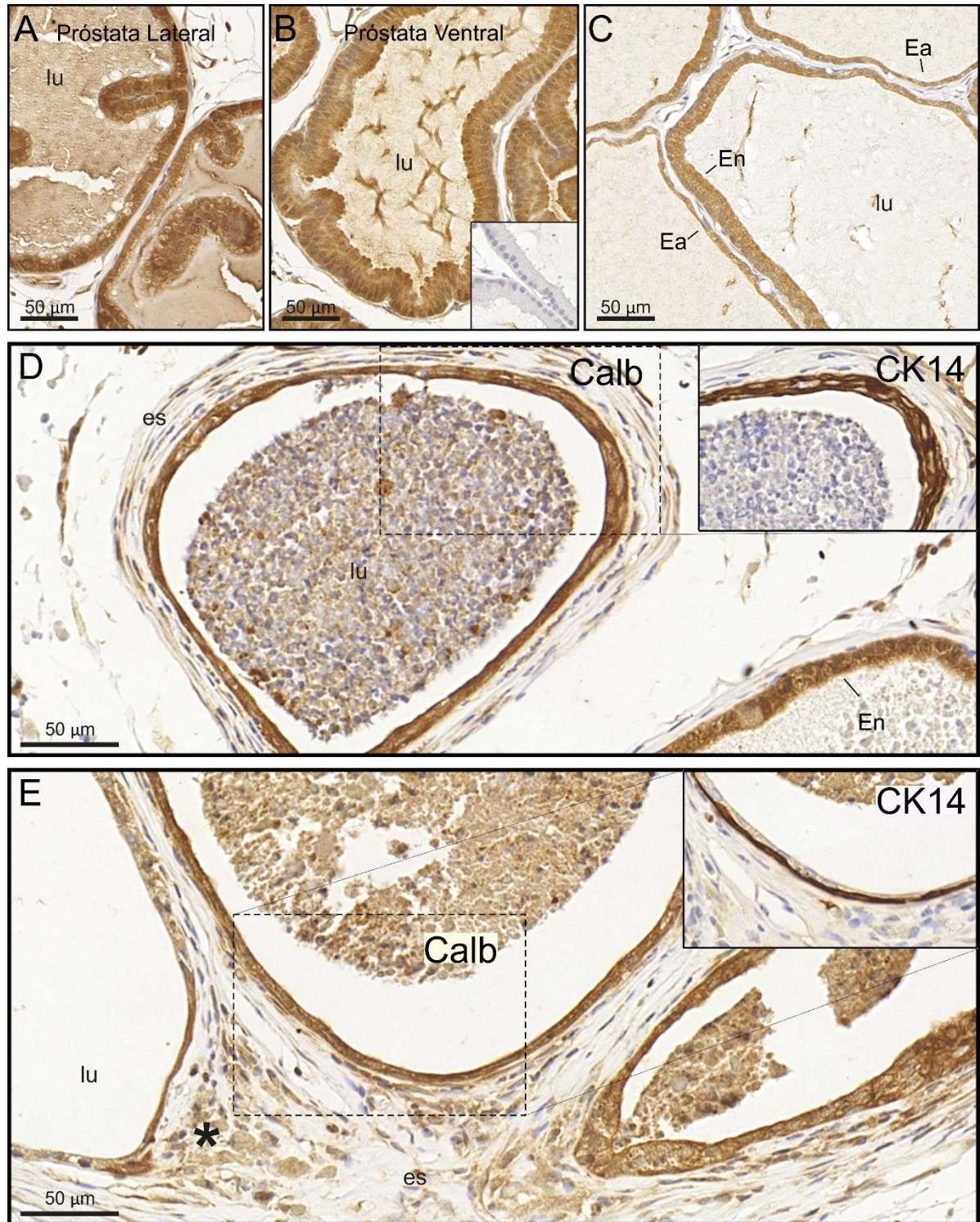


Figura 21. Localização de calbindina no epitélio normal e alterado das próstatas ventral e lateral de ratos Wistar. Calb foi amplamente localizada no citoplasma de células epiteliais prostáticas da LP (A) e VP (B). A expressão de calb não foi alterada em epitélios atróficos (Ea; C), metaplasia escamosa (D) ou PIA (E), em relação ao epitélio normal (En). Inseto em B: controle negativo; lu: lúmen; es: componentes do estroma. As figuras são representativas de 3 ensaios independentes

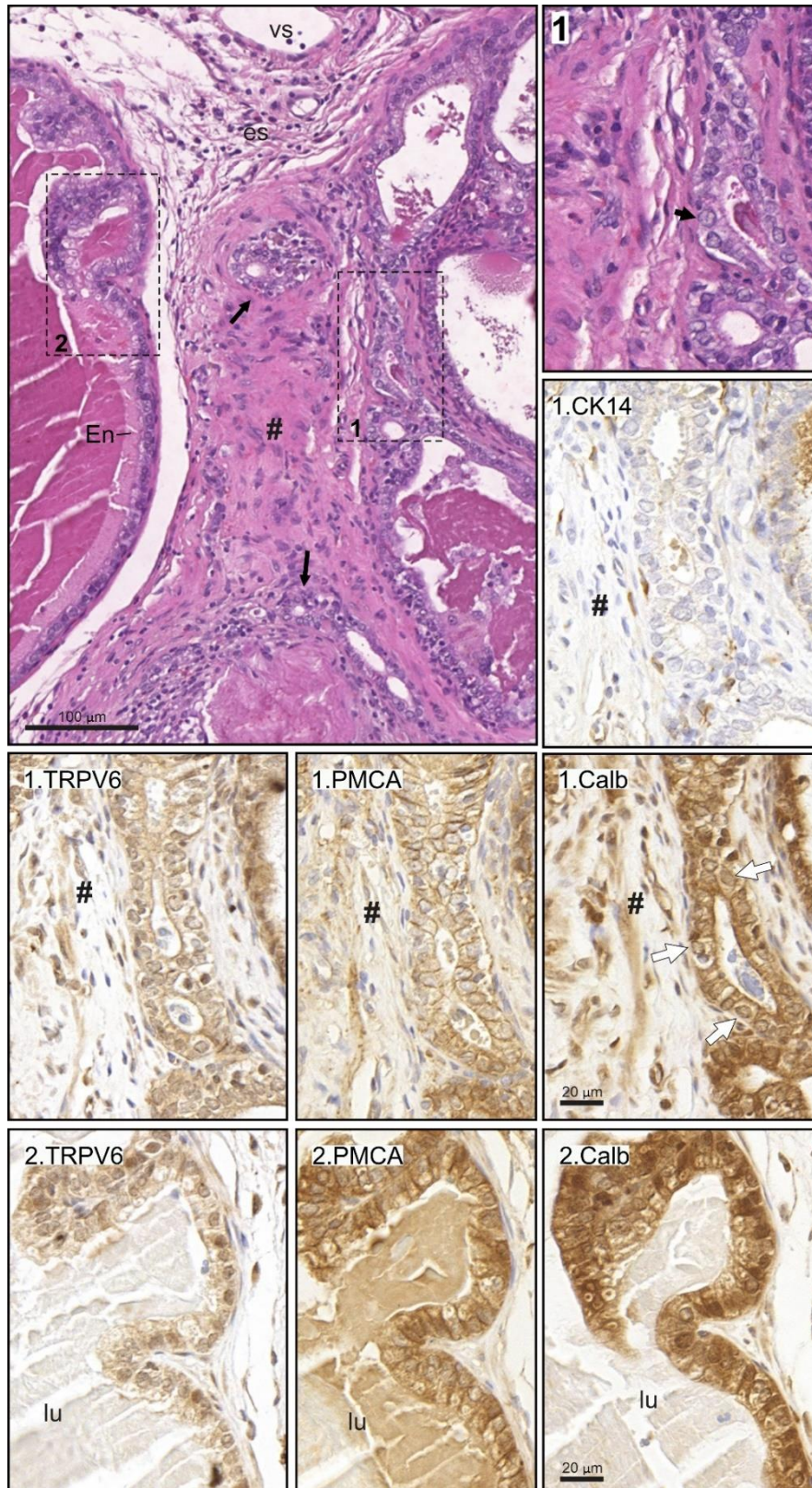


Figura 22. Localização de TRPV6, PMCA e calbindina em adenocarcinoma bem diferenciado da próstata de ratos Wistar. Em coloração por H&E, imagem em menor aumento mostra microacinos (setas longas) circundados por estroma espesso (#). Seções sequenciais demonstram imunomarcagem para CK14, TRPV6, PMCA e calb em um grupo de microacinos (1) contendo células atípicas (seta curta), assim como no epitélio inalterado de adenômero adjacente (2). Enquanto os níveis de TRPV6 se mostraram aparentemente inalterados, PMCA e calb (setas brancas) foram menos expressos por células neoplásicas. es: componentes do estroma; lu: lúmen; En: epitélio normal; vs: vaso sanguíneo. As figuras são representativas de 3 ensaios independentes.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, a expressão de TRPV6, PMCA e calbindina foi avaliada na próstata de ratos jovens a senis e submetidos a indução hormonal da carcinogênese por T+E₂. Este estudo é pioneiro em investigar, de forma conjunta e sistemática, a expressão das principais proteínas mediadoras do transporte transepitelial de Ca²⁺ na próstata saudável e alterada de ratos.

Os resultados obtidos mostram pela primeira vez, a expressão do canal de influxo de Ca²⁺ TRPV6 e da bomba de extrusão PMCA no complexo prostático de ratos Wistar, em comparação a rins, duodeno e fígado, órgãos sabidamente responsivos a hormônios calcitropicos, como calcitriol, os quais estão envolvidos na regulação da disponibilidade de Ca²⁺ circulante (Holick, 2004; Hoenderop, *et al.* 2005). TRPV6 foi expresso nas próstatas ventral e lateral em níveis superiores aos observados para os lobos dorsal e anterior, assim como para rins e duodeno, corroborando estudos anteriores que reportaram altos níveis de seu mRNA na próstata de camundongos, superando os de estômago, cérebro, rins, duodeno, entre outros tecidos (Nijenhuis, *et al.*, 2003). A expressão de TRPV6 detectada no fígado superou os níveis proteicos dos demais órgãos analisados. A presença de transcritos de *TRPV6* foi demonstrada previamente em tecidos hepáticos humanos e murinos (Peng, *et al.*, 2000; Su, *et al.*, 2004; Weber, *et al.*, 2001; GeneCards, 2019). Contudo, não foram encontrados estudos demonstrando seus níveis de expressão, seja por mRNA ou níveis proteicos, em comparação a outros órgãos.

TRPV6 foi detectado em todos os tecidos avaliados através de banda proteica principal de cerca de 83 kDa, corroborando dados da literatura (Gao, *et al.*, 2016). Extratos proteicos totais dos rins e fígado também apresentaram banda adicional de aproximadamente 75 kDa, a qual foi anteriormente reportada como sendo correspondente à forma não glicosilada do canal (Skrypski, *et al.*, 2015). Ainda não está claro qual é o papel desses glicosídeos para a função de TRPV6 e poucos são os trabalhos que fazem menção à presença dessa variação, porém, tal modificação pós-traducional parece estar relacionada a mecanismos intrínsecos de cada tecido, uma vez que apenas rins e fígado de ratos Wistar jovens apresentaram suas duas formas. De modo similar, células β pancreáticas de ratos também apresentaram TRPV6 em suas formas glicosilada e não glicosilada (Skrypski, *et al.*, 2015), assim como células humanas transfectadas em ensaios *in vitro* (Hirnet, *et al.*, 2003).

Em relação à expressão de PMCA, *Western blotting* revelou a presença de uma banda de aproximadamente 127 kDa nos tecidos de rato Wistar. Essa ATPase pode ser sintetizada a partir da transcrição de quatro genes diferentes, sendo cada um dos quatro transcritos passível de *splicing* alternativo nos sítios A e/ou C, dando origem às isoformas z-w ou a-f, respectivamente (Hoenderop, *et al.*, 2005; Delgado-Coelho & Mas-Oliva, 2014). O anticorpo primário anti-PMCA utilizado neste trabalho (clone 5F10), é capaz de reconhecer todas as suas isoformas. Sendo assim, considerando apenas seu peso molecular (Filoteo, *et al.*, 1997), é provável que a proteína encontrada seja correspondente a uma das seguintes isoformas: PMCA1a (129,509 kDa), PMCA2az (127,328 kDa), PMCA3a (127,295 kDa), ou PMCA4a (128,919 kDa). Contudo, enfatiza-se que PMCA2 e PMCA3 tem sido descritas principalmente em células neuronais e fibras musculares, sendo PMCA1 e PMCA4 mais amplamente distribuídas pelos demais tecidos do organismo (Stauffer, *et al.*, 1993). Nesse cenário, PMCA1 foi altamente expressa por células epiteliais da próstata anterior de ratos (Post, *et al.*, 2008), enquanto PMCA4 aparenta desempenhar papel importante no trato genital masculino, tendo sido identificada nos testículos, epidídimos, vesículas seminais e espermatozoides de roedores e bovinos (Okunade, *et al.*, 2004; Wilhelm, *et al.*, 2008; Brandenburger, *et al.*, 2011).

Análise quantitativa da expressão de PMCA em ratos Wistar jovens mostrou que o fígado dispõe dos maiores níveis, seguido pelo rim, próstata e duodeno. Este achado está de acordo com outros estudos conduzidos em tecidos de humanos e ratos, nos quais elevada expressão foi verificada no fígado, superando a dos rins ou intestino (Stauffer, *et al.*, 1993; Howard, *et al.*, 1994; Reinhardt, *et al.*, 2000). No complexo prostático, PMCA foi detectada, em ordem decrescente quanto aos seus níveis de expressão: VP > LP > DP = AP; sendo que as próstatas dorsal e anterior, assim como duodeno, tiveram expressão em níveis indetectáveis nas condições experimentais aplicadas. Os dados aqui apresentados são inéditos na literatura, uma vez que não foram encontrados trabalhos dedicados à investigação de PMCA na próstata em comparação a outros órgãos, e reforçam uma individualidade funcional de cada lobo prostático que deve ser levada em consideração para um melhor entendimento da fisiopatologia da glândula.

Dentre o complexo prostático, a próstata lateral foi elegida para as investigações histopatológicas subsequentes, tendo em vista seus elevados níveis de expressão de TRPV6 e PMCA e considerando que este é o principal lobo de desenvolvimento de alterações proliferativas decorrentes do envelhecimento, sendo histologicamente homóloga à zona periférica da próstata humana e mais susceptível à indução de displasias (McNeal, *et al.*, 1988;

Shappell, *et al.*, 2004; Ricke *et al.*, 2008; Galheigo *et al.*, 2016; Campolina-Silva, *et al.*, 2020). Adicionalmente, o lobo ventral foi estabelecido como alvo igualmente importante, dada a proeminente expressão dos transportadores-alvo e devido ao fato de ser o maior e mais bem descrito lobo prostático de roedores (Aumüller, 1979; Hayashi, *et al.*, 1991; Shappell, *et al.*, 2004; Risbridger & Taylor, 2006; Morais-Santos, *et al.*, 2015). Os resultados obtidos através de imunohistoquímica das próstatas ventral e lateral evidenciaram uma distribuição diferencial de TRPV6 e PMCA no epitélio prostático normal. Ambos os transportadores tiveram imunomarcção aparentemente mais pronunciada em porções glandulares distais da LP, independentemente da idade dos animais. Sabe-se que o parênquima prostático é composto por um complexo sistema túbulo-alveolar ramificado a partir da uretra, sendo possível a identificação morfofisiológica das regiões proximal, intermediária e distal (Risbridger & Taylor, 2006). Ductos principais e secundários emergentes da uretra integram a região proximal, destacando-se por seus epitélios colunares baixos (Hayashi, *et al.*, 1991). Inúmeras são as evidências de que as regiões proximais do epitélio prostático desempenham papéis regulatórios da função do órgão, uma vez que abrigam a maior parte da população de células neuroendócrinas (Abrahamsson & di Sant'Agnesse, 1993; Risbridger & Taylor, 2006); tendo sido identificadas também como o nicho principal de células-tronco multipotentes (Burger, *et al.*, 2005; Moad, *et al.*, 2017). Em contrapartida, as regiões intermediárias e distais do epitélio estão ativamente envolvidas na secreção do líquido prostático, sendo também as regiões com maior taxa proliferativa em condições fisiológicas (De Marzo, *et al.*, 1998). Essas particularidades fenotípicas de células epiteliais ao longo do eixo proximal-distal podem explicar a elevada expressão de TRPV6 e PMCA nos adenômeros glandulares da LP e apontam para um transporte transepitelial de Ca^{2+} mais robusto nessas regiões. Uma vez que a VP apresentou reduzida expressão proximal de TRPV6, com distribuição aparentemente homogênea de PMCA ao longo de todo o epitélio, novas investigações se tornam necessárias para determinar possíveis diferenças na composição iônica e no fluxo transepitelial de Ca^{2+} entre os lobos prostáticos de ratos.

Em relação ao epitélio glandular, os ensaios imunohistoquímicos para TRPV6 mostraram moderada positividade para o canal no citoplasma de células luminais, sem uma clara localização nas membranas plasmáticas, como se esperaria de uma proteína transmembrana, responsável pela captação de Ca^{2+} extracelular. Tal distribuição citoplasmática de TRPV6 foi previamente descrita em estudos envolvendo diferentes órgãos (Lee, *et al.*, 2009 – útero e placenta; Lehen'kyi, *et al.*, 2007, 2011 – linhagem celular de câncer de próstata; Yang, *et al.*,

2011 – endométrio; Skrzypski, *et al.*, 2015 – ilhotas pancreáticas). Regiões distintas de um mesmo órgão também podem apresentar diferentes localizações subcelulares de TRPV6, o qual foi observado no pólo apical do epitélio epididimário de rato, especificamente nos segmentos inicial, corpo e cauda, contrastando com expressão citoplasmática na região da cabeça (Gao, *et al.*, 2016). Da mesma maneira, TRPV5 e TRPV6 foram localizados apicalmente apenas em regiões do néfron envolvidas na reabsorção de cálcio, sendo fracamente expressos no citoplasma de células da maior parte do parênquima renal de camundongos (Loffing, *et al.*, 2001; Nijenhuis, *et al.*, 2003). Esses achados podem ser explicados pelo envolvimento de TRPV6 em um processo chamado “entrada de cálcio operada por estoque” (SOCE, *Store Operated Calcium Entry*), no qual TRPV6 se associa aos ionóforos ORAI1 e TRPC1 após depleção dos estoques intracelulares de cálcio, sendo, então, translocado para a membrana plasmática (Raphaël, *et al.*, 2014). Assim é possível supor que em órgãos nos quais sua atuação não seja contínua, TRPV6 poderia estar presente em *pools* citoplasmáticos, recrutados mediante estímulos específicos para o reestabelecimento dos níveis basais de Ca^{2+} intracelular.

PMCA foi detectada principalmente na membrana plasmática basolateral de células epiteliais prostáticas. Sabe-se que o epitélio prostático é constituído por células polarizadas, cujas membranas plasmáticas dispõem dos domínios apical e basolateral, possibilitando a compartimentalização de proteínas transmembrana específicas e permitindo o transporte direcionado de substâncias secretadas. Dessa forma, a localização subcelular da bomba de extrusão de cálcio sugere que o íon esteja sendo transportado para o espaço intercelular, em direção à membrana basal, assim como ocorre nos túbulos renais e epidídimos, por exemplo (Loffing, *et al.*, 2001; Hoenderop, *et al.*, 2005; Wilhelm, *et al.*, 2008; Brandenburger, *et al.*, 2011). Entretanto, o canal TRPV6, que promove sua entrada nas células, não apresentou uma clara localização no domínio apical, sendo ainda altamente expresso por uma subpopulação de células basais prostáticas, aqui denominadas cb-TRPV6⁺⁺. Considerando a elevada quantidade de cálcio contida no fluido prostático (Huggins, *et al.*, 1942; Kavanagh, 1985), deve-se admitir que o íon seria transportado também para o lúmen e não, necessariamente, a partir dele. Um ponto importante é que o elevado gradiente eletroquímico gerado pelas altas concentrações de citrato secretadas no lúmen (Kavanagh, 1985), pode ser suficiente para que os cátions localizados no espaço intercelular atravessassem passivamente as junções de oclusão entre células epiteliais colunares, atingindo assim o lúmen prostático. Assim, propõe-se que a expressão dos transportadores TRPV6 e PMCA por células epiteliais prostáticas tenha como função principal a manutenção dos níveis de Ca^{2+} no ambiente intracelular, modulando indiretamente as

atividades celulares estimuladas por esse segundo mensageiro, tais como proliferação, diferenciação e morte, como descrito anteriormente em estudos envolvendo diversos tipos celulares (Schwab, *et al.*, 2002 – neurônios; Schwarz, *et al.*, 2006 – células renais; Lehen'kyi, *et al.*, 2007 – células de câncer de próstata; Aung, *et al.*, 2009 – células de câncer colorretal; Raphaël, *et al.*, 2014 – células de câncer de próstata; Li, *et al.*, 2018 – cardiomiócitos). De fato, esses dois transportadores são encontrados amplamente distribuídos pelo organismo e não apenas em órgãos que medeiam o transporte de cálcio entre dois compartimentos biológicos, como o trato gastrointestinal, rins e epidídimos, indicando que o transporte transepitelial de cálcio pode ser apenas uma de suas inúmeras funções na próstata (Stauffer, *et al.*, 1993; Peng, *et al.*, 2000; García, *et al.*, 2002; Hirnet, *et al.*, 2003; Nijenhuis, *et al.*, 2003; Wilhelm, *et al.*, 2008; Brandenburger, *et al.*, 2011; Yang, *et al.*, 2011; Skrypski, *et al.*, 2015; Gao, *et al.*, 2016; Li, *et al.*, 2018).

De um modo geral, células basais prostáticas CK14⁺ mostraram-se positivas para os três transportadores-alvo deste trabalho: TRPV6, PMCA e calbindina. Apesar disto, células basais não têm sido relacionadas ao transporte transepitelial de cálcio. Corroborando os resultados aqui expostos, Campolina-Silva e colaboradores (2018) reportaram maior expressão de VDR e do receptor a ele associado, RXR, em células basais prostáticas em comparação às demais células epiteliais, indicando sua capacidade de responder aos efeitos de calcitriol, dentre os quais destaca-se a expressão de transportadores de cálcio (Blomberg Jensen, *et al.*, 2014). Ainda que sua atuação na regulação da fisiopatologia prostática seja pouco clara, células progenitoras e tronco foram identificadas entre a população de células basais prostáticas (Tsujiyama, *et al.*, 2002; Burger, *et al.*, 2005; Taylor & Risbridger, 2006; Wang, *et al.*, 2014; Toivanen, *et al.*, 2016; Moad, *et al.*, 2017); as quais também têm sido indicadas como importantes mediadoras do metabolismo de andrógenos e estrógenos (El-Alfy, *et al.*, 2000; Takase, *et al.*, 2006; Morais-Santos, *et al.*, 2018). Adicionados à literatura, os dados aqui demonstrados sugerem que células basais estão mais ativamente envolvidas na captação de cálcio extracelular via TRPV6, seja devido a uma demanda metabólica intrínseca ou pelo seu potencial de contactar fisicamente outras células epiteliais através de suas longas projeções citoplasmáticas (Soeffing & Timms, 1995; Hayward, *et al.*, 1996; Shum, *et al.*, 2008), sendo portanto possíveis protagonistas para a manutenção da homeostase de cálcio nos demais tipos celulares do epitélio prostático.

cb-TRPV6⁺⁺ foram detectadas na próstata de ratos Wistar em todas as idades avaliadas. A frequência dessas células não sofreu variações significativas ao longo do envelhecimento quando o epitélio prostático total foi avaliado. Porém, ressalta-se a ocorrência de uma elevada

dispersão de dados entre animais senis pertencentes ao mesmo grupo experimental. Uma vez que ratos idosos apresentam maior incidência de lesões prostáticas com desequilíbrio da razão células luminais / células basais (Morais-Santos, *et al.*, 2015, 2018; Campolina-Silva, *et al.*, 2020), tal flutuação amostral sugere que a ocorrência de alterações moleculares que levam à superexpressão de TRPV6 em uma subpopulação de células basais pode ser um evento inicial no desenvolvimento de alterações histopatológicas na próstata de ratos. Dados quantitativos aqui demonstrados revelam uma maior abundância de cb-TRPV6⁺⁺ em sítios de metaplasia escamosa e PIA, enquanto essa subpopulação de células basais não foi detectada em atrofia epiteliais. Lesões com enriquecimento de células basais são mais frequentes na próstata lateral senil de ratos Wistar em comparação aos animais jovens e ao lobo ventral da próstata destes animais idosos (Morais-Santos, *et al.*, 2018; Campolina-Silva, *et al.*, 2020), o que poderia justificar a detecção de elevados níveis proteicos deste canal de cálcio por *Western blotting* na LP aos 24 meses.

As proteínas-alvo deste estudo tiveram seus padrões de expressão avaliados em áreas de alterações histopatológicas da próstata de ratos Wistar, utilizando-se o modelo experimental de envelhecimento fisiológico e a indução hormonal da carcinogênese através de tratamento crônico com T+E₂. O mecanismo de ação da testosterona em associação ao estradiol para o desenvolvimento de alterações pré-malignas e malignas ainda não foi completamente determinado. Porém, há indícios de que, juntos, esses hormônios esteroides atuam no organismo masculino de modo similar ao desbalanço hormonal que ocorre naturalmente com o avançar da idade, no qual a ação de estrógenos é favorecida em detrimento dos andrógenos (Cunha, *et al.*, 2001). Interessantemente, no presente estudo, animais expostos a T+E₂ apresentaram aumento significativo da frequência de cb-TRPV6⁺⁺ no epitélio prostático histologicamente inalterado, em relação ao grupo controle. A intensa expressão de TRPV6 por uma subpopulação de células basais representou, ainda, uma maior expressão geral desse canal nos epitélios metaplásicos escamosos e em PIA, lesões prostáticas classicamente reconhecidas pela hiperproliferação de células basais (Risbridger, *et al.*, 2001a; De Marzo, *et al.*, 2016; Packer & Maitland, 2016; Puhr, *et al.*, 2016). Estudo recente de nosso grupo de pesquisa mostrou elevada expressão de ER α nessas lesões, em comparação ao epitélio normal e uma particularidade fenotípica entre células basais prostáticas, as quais frequentemente tiveram alta positividade para aromatase, enzima responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos, seguindo padrão semelhante ao demonstrado para TRPV6 (Morais-Santos, *et al.*, 2018).

A metaplasia escamosa da próstata adulta é uma alteração histopatológica que se desenvolve a partir de uma maior ativação de ER α mediante aumento dos estímulos desencadeados por estrógenos circulantes (Andersson & Tisell, 1982; Risbridger, *et al.*, 2001b). Em contrapartida, acredita-se que a PIA seja desenvolvida mediante estímulos inflamatórios exacerbados, os quais elevam o estresse oxidativo local e provocam hiperativação das vias de sinalização pró-sobrevivência e antiapoptóticas (De Marzo, *et al.*, 2016; Packer & Maitland, 2016; Puhr, *et al.*, 2016). Nesse sentido, sabe-se que o influxo de Ca²⁺ mediado por TRPV6 é capaz de estimular a proliferação e promover sobrevivência celular, mesmo em condições de baixa disponibilidade do íon livre (Schwarz, *et al.*, 2006; Lehen'kyi, *et al.*, 2007; Raphaël, *et al.*, 2014), tendo sido reportada, por exemplo, associação direta entre estresse de retículo endoplasmático e a ativação do promotor de *TRPV6*, levando à sua maior transcrição e, conseqüentemente, à inibição de vias de apoptose em cardiomiócitos em isquemia (Li, *et al.*, 2018). Os resultados deste trabalho mostraram que a maior parte da população de células basais presente em metaplasias escamosas e PIA dispõem de elevada expressão de TRPV6. Esses dados indicam que células basais expostas a um microambiente hormonal favorável à proliferação, no caso da metaplasia, ou desfavorável à sobrevivência, no caso da PIA, têm como característica em comum uma maior síntese de estrógenos e ativação de ER α localmente (Morais-Santos, *et al.*, 2018), e a superexpressão de TRPV6, seja devido à proliferação da pequena porcentagem de cb-TRPV6⁺⁺ já presentes no epitélio inalterado, ou ainda pela modulação de mecanismos epigenéticos. Notavelmente, há evidências de que a administração de estrógenos pode estimular a transcrição dos transportadores transepiteliais de cálcio, incluindo TRPV6, PMCA e calbindina, *in vivo* (Van Abel, *et al.*, 2002; Öz, *et al.*, 2007).

Simultaneamente à expansão da população de células basais intensamente positivas para TRPV6, observou-se também uma drástica redução da expressão de PMCA em lesões prostáticas de metaplasia escamosa e PIA. Dado o elevado estresse oxidativo associado à PIA, esses resultados corroboram achados de que a presença de espécies reativas de oxigênio é capaz de provocar uma depleção nos transportadores PMCA e NCX presentes na membrana plasmática de neurônios (Kip & Strehler, 2007). Além disso, acredita-se que uma menor expressão de PMCA, associada ou não a maiores níveis de canais de cálcio como TRPV6, oferece às células condições para a ativação de vias de proliferação dependentes de Ca²⁺ (Monteith, *et al.*, 2007; Aung, *et al.*, 2009). No presente trabalho, observou-se ainda uma redução da localização de PMCA na membrana plasmática basolateral de células atroficas, em comparação ao epitélio normal adjacente. Diferentemente da PIA, que ocorre pontualmente

apenas na LP, áreas de atrofia epitelial são frequentemente observadas na próstata de ratos Wistar a partir dos 12 meses de idade, sendo mais incidentes na VP (Morais-Santos, *et al.*, 2015; Campolina-Silva, *et al.*, 2020). Morfologicamente, essas lesões são caracterizadas por uma redução da altura do epitélio colunar da próstata, o qual pode assumir, dependendo do grau de atrofia, organização pavimentosa (McNeal, 1988). Recentemente, investigação conduzida por nosso grupo de pesquisa registrou um aumento significativo da expressão dos fatores citoprotetores ERK1/2, AKT e NF- κ B em associação a aumento de caspase-8 em áreas de atrofia epitelial da VP de ratos Wistar (Gonzaga, *et al.*, 2017). Hipotetiza-se que um possível aumento da concentração intracelular de cálcio em epitélios atróficos, devido ao comprometimento do principal mecanismo de sua extrusão, sem que os níveis de TRPV6 e calbindina fossem alterados, pode estar associado ao estímulo de sobrevivência nestas áreas específicas, uma vez que a manutenção de elevados níveis intracelulares de Ca^{2+} pode atenuar a propagação de sinais de morte (Bruce, 2013; Raphaël, *et al.*, 2014; Déliot & Constantin, 2015).

Corroborando as evidências de que PMCA pode participar do controle do ciclo celular (Monteith, *et al.*, 2007; Aung, *et al.*, 2009), também foi notada menor positividade para a ATPase em regiões de PIN, as quais são descritas como lesões pré-malignas devido ao seu alto potencial proliferativo e por abrigarem alterações moleculares implicadas no processo de carcinogênese, tais como superexpressão de fatores de transcrição ETS e níveis reduzidos do marcador de diferenciação NKX3.1 (Shappell, *et al.*, 2004; De Marzo, *et al.*, 2016; Packer & Maitland, 2016; Pühr, *et al.*, 2016). Calbindina também mostrou-se menos expressa em regiões de PIN, indicando um comprometimento do tamponamento e efluxo de Ca^{2+} exatamente nos sítios de origem do câncer. Esses dados suportam evidências da literatura de que assim como PMCA, calbindina tem participação no processo de proliferação celular, tendo sido reportada sua redução em queratinócitos durante o reparo tecidual (Jin, *et al.*, 1997). Apesar de não terem sido observadas variações evidentes na intensidade de imunomarcagem para PMCA no epitélio normal da próstata ao longo do envelhecimento, sua menor detecção em lesões de metaplasia escamosa, PIA, atrofia e PIN pode justificar os baixos níveis de expressão dessa ATPase no extrato tecidual total da VP e LP de animais idosos em ensaios de *Western blotting*.

Os receptores VDR e ER β , ambos envolvidos na promoção de sinais antiproliferativos e pró-diferenciação nos tecidos (Peehl, *et al.*, 1994; Weihua, *et al.*, 2002; Leman, *et al.*, 2003; Imamov, *et al.*, 2004; Minelli, *et al.*, 2009), foram similarmente reduzidos em focos de PIN do epitélio prostático de ratos Wistar (Morais-Santos, *et al.*, 2018; Campolina-Silva, *et al.*, 2018).

Esses achados demonstram que a redução de sinais promovidos por calcitriol pode estar causando uma redução na abundância desses transportadores de cálcio nessas regiões, apontando ainda para uma possível atuação de estrógenos na síntese de PMCA e calbindina na próstata, como previamente demonstrado (Van Abel, *et al.*, 2002; Öz, *et al.*, 2007; Blomberg Jensen, *et al.*, 2010).

Seguindo padrão de expressão similar ao observado para as lesões de PIN, adenocarcinomas prostáticos bem diferenciados identificados na LP de ratos Wistar idosos ou submetidos a tratamento com T+E2 apresentaram expressão aparentemente inalterada de TRPV6, associada a redução de PMCA e calbindina. Em conjunto, esses dados reforçam o princípio de que as células epiteliais presentes em lesões de PIN apresentam um perfil proteômico que as distingue de células saudáveis e que se aproxima do fenótipo observado para células cancerosas. Os resultados aqui demonstrados sugerem ainda que o epitélio prostático de ratos Wistar sofre uma perturbação no controle da disponibilidade de Ca^{2+} intracelular a partir de fases iniciais da carcinogênese, com alteração na expressão dos transportadores transepiteliais de cálcio já em sítios de PIA e PIN. Tais alterações parecem ser mantidas durante o processo de transição entre PIN e adenocarcinoma.

Os transportadores de cálcio investigados no presente estudo foram previamente associados à fenótipos malignos de diversos tipos de câncer em humanos (Watanabe, *et al.*, 1994; Peng, *et al.*, 2001; Pelc, *et al.*, 2002; Monteith, *et al.*, 2007; Lee, *et al.*, 2008; Jung, *et al.*, 2011; Lee, *et al.*, 2011; Meng, *et al.*, 2011; Huang, *et al.*, 2017; Jin, *et al.*, 2019). Dentre os três transportadores-alvo avaliados, apenas TRPV6 já havia sido demonstrado em câncer de próstata humano, de modo que sua expressão foi significativamente elevada em relação à tecidos normais ou de HPB, correlacionando-se com o estadiamento de Gleason (Peng, *et al.*, 2001; Wissenbach, *et al.*, 2001; Zhuang, *et al.*, 2002; Fixemer, *et al.*, 2003). Além do câncer de próstata, TRPV6 se mostrou superexpresso em outros cânceres, incluindo os de mama, tireoide, ovário e colorretal (Lehen'kyi, *et al.*, 2012; Nilius & Szallasi, 2014). Esses resultados não estão em acordo com os dados aqui apresentados, nos quais as células de câncer permaneceram aparentemente inalteradas quanto à sua positividade para TRPV6, em relação aos epitélios inalterados da próstata de ratos Wistar. Além disso, reportou-se aqui a presença de células basais intensamente marcadas para TRPV6 em alguns focos de adenocarcinoma prostático. Sabe-se que a ausência de células basais é uma das principais características do câncer de próstata, regra esta que possui algumas exceções, ainda que pouco frequentes (Robinson, *et al.*, 2012; Tan, *et al.*, 2015; Epstein, *et al.*, 2016; Le Magnen, *et al.*, 2018; Torres, *et al.*, 2018). O

papel das células basais prostáticas durante o desenvolvimento de lesões malignas ainda é pouco claro, porém há um grande número de evidências que suportam a hipótese de que estas são as células de origem do câncer (Bonkhoff, *et al.*, 1994; Stoyanova, *et al.*, 2013; Kwon, *et al.*, 2014; Packer & Maitland, 2016). Assim, o intrigante achado de algumas dessas células localizadas em lesões neoplásicas e expressando intensamente TRPV6, canal de grande relevância clínica em tumores humanos, pode contribuir para um melhor entendimento sobre a carcinogênese prostática. Novas perspectivas alertam para a necessidade um estudo mais aprofundado acerca dos mecanismos moleculares reguladores dos níveis de expressão de TRPV6 especificamente em células basais e seus possíveis impactos na transformação celular para fenótipos malignos.

Em relação à bomba de Ca^{2+} PMCA, registrou-se aqui significativa redução em sua positividade em células de adenocarcinoma prostático, em comparação ao epitélio inalterado. A expressão dessa ATPase por células de câncer varia grandemente dependendo da isoforma investigada e do tecido tumoral de origem, tendo sido reportada maior detecção de PMCA1 e PMCA2 em câncer de mama (Lee, *et al.*, 2002, 2005; VanHouten, *et al.*, 2010); e baixa detecção de PMCA1 em carcinoma oral de células escamosas e em fibroblastos da pele transformados (Reisner, *et al.*, 1997; Saito, *et al.*, 2006). Ainda, os níveis de PMCA4 foram reduzidos em câncer colorretal, quando comparados aos de tecidos benignos, sendo que a expressão da proteína foi positivamente associada ao grau de diferenciação de células de câncer *in vitro* (Aung, *et al.*, 2009). Dentre as etapas que constituem o transporte transcelular de cálcio, a extrusão é a única que ocorre contra um alto gradiente eletroquímico, sendo, portanto, desempenhada por bombas ou trocadores através de transporte ativo (Hoenderop, *et al.*, 2005). PMCA é uma proteína composta por dez domínios transmembranares e quatro domínios (*loops*) citoplasmáticos, sendo estes essenciais para a regulação da sua função (Bruce, 2013). A sua ativação depende principalmente da ligação do complexo Ca^{2+} -calmodulina ao seu domínio auto-inibitório e da presença de ATP, que é desfosforilada pelo domínio catalítico. Além desses dois fatores ativadores, PMCA também pode ter sua atividade potencializada pela ligação de fosfolipídeos e pela fosforilação pelas quinases PKA e PKC em domínios específicos (Bruce, 2013). Considerando que PMCA requer a atuação conjunta de tantos fatores estimulatórios para a sua completa funcionalidade e ainda, que diferentes alterações genéticas e epigenéticas estão presentes em cânceres de variadas origens, é possível compreender a heterogeneidade observada entre diferentes tipos de neoplasias quanto à expressão desse transportador.

Calbindina sofreu reduções pontuais em células epiteliais do câncer de próstata de ratos Wistar. Em contraste, elevada expressão foi descrita para essa proteína ligante de Ca^{2+} em células de osteossarcoma (Huang, *et al.*, 2017), além de meduloblastoma e tumores do endométrio e pulmão, nos quais sua expressão pelas células neoplásicas foi correlacionada a piores prognósticos (Watanabe, *et al.*, 1994; Pelc, *et al.*, 2002; Lee, *et al.*, 2008; Jung, *et al.*, 2011; Meng, *et al.*, 2011; Jin, *et al.*, 2019). Alguns desses estudos reportaram ainda uma associação entre expressão de calbindina e maior proliferação e resistência a apoptose (Jung, *et al.*, 2011; Huang, *et al.*, 2017; Jin, *et al.*, 2019), em oposição a achados de Jin e colaboradores (1997), que observaram redução na expressão dessa proteína no epitélio da epiderme em proliferação. Sabe-se que o envolvimento do íon cálcio em diferentes vias de sinalização celular é complexo, sendo que os efeitos gerados por mudanças em sua concentração basal são, muitas vezes, antagônicos (Monteith, *et al.*, 2007). Os resultados obtidos através de imunomarcação para transportadores transepiteliais de cálcio mostram que o adenocarcinoma prostático de ratos Wistar idosos ou submetidos a tratamento com T+E₂ é similar à lesão encontrada em humanos, apresentando alterações moleculares que podem contribuir para um melhor entendimento sobre a carcinogênese da glândula nas duas espécies. Porém, algumas divergências foram notadas, reforçando a necessidade de cautela para a interpretação de resultados provenientes de modelos animais.

Ainda que os métodos empregados neste estudo não sejam capazes de fornecer informações que permitam afirmar quanto ao nível de funcionalidade das proteínas-alvo presentes, os resultados fornecem indícios de que a variação da expressão de TRPV6, PMCA e calbindina, especialmente em sítios de lesões teciduais, pode estar promovendo um desbalanço na homeostase de cálcio na próstata de ratos e, possivelmente, favorecendo o desenvolvimento de lesões malignas. A abordagem investigativa utilizada neste trabalho pode contribuir para um melhor entendimento da fisiopatologia prostática, uma vez que esse trio de proteínas desempenham papel crucial na manutenção da homeostase intracelular de Ca^{2+} , sendo também fundamentais na modulação de funções celulares, incluindo sinais para a proliferação, sobrevivência e morte celulares, em vários tecidos (Carafoli, 1991; Reisner, *et al.*, 1992; Hoenderop, *et al.*, 2005; Kojetin, *et al.*, 2006; Post, *et al.*, 2008; Brandenburger, *et al.*, 2011; Jung, *et al.*, 2011; Bruce, 2013; Na & Peng, 2014; Wolf & Wennemuth, 2014).

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, expressão do canal de influxo de Ca^{2+} TRPV6 e da bomba de extrusão PMCA em todo o complexo prostático de ratos Wistar, em comparação a outros órgãos. Os dados obtidos indicam que o transporte transepitelial de cálcio ocorre de modo mais acentuado nas próstatas ventral e lateral, as quais apresentaram os maiores níveis proteicos de TRPV6 e PMCA em relação aos demais lobos prostáticos. As proteínas promotoras do transporte transepitelial de Ca^{2+} TRPV6, PMCA e calbindina tiveram seus padrões de expressão alterados em diferentes áreas de lesões prostáticas de caráter predominantemente proliferativo, como metaplasia escamosa, PIN e adenocarcinoma; ou antiapoptótico, como PIA e atrofia. As variações observadas quanto aos padrões de expressão destas proteínas em pontos específicos de alterações histológicas do epitélio prostático, sugerem que mudanças na sinalização intracelular de cálcio, podem estar relacionadas ao desenvolvimento de lesões prostáticas frequentemente encontradas na próstata senescente, consequentemente influenciando na origem e desenvolvimento de patologias prostáticas. Além disto, a expressão das proteínas-alvo deste trabalho por células basais, incluindo uma subpopulação intensamente positiva para TRPV6, fornece perspectivas quanto a uma participação ativa dessas células no transporte de cálcio através do epitélio prostático normal e durante a carcinogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamsson PA, di Sant'Agnese PA. Neuroendocrine cells in the human prostate gland. *Journal of andrology*. 1993;14(5):307-9.
- Andersson H, Tisell LE. Morphology of rat prostatic lobes and seminal vesicles after long-term estrogen treatment. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica Section A, Pathology*. 1982;90(6):441-8.
- Aumüller, G. Prostate Gland. In: Aumüller, G. **Prostate Gland and Seminal Vesicles**. 2. ed. Berlin: Springer, 1979. p. 53-182.
- Aumüller G, Doll A, Wennemuth G, Dizayi N, Abrahamsson PA, Wilhelm B. Regional distribution of neuroendocrine cells in the urogenital duct system of the male rat. *The Prostate*. 2012;72(3):326-37.
- Aung CS, Ye W, Plowman G, Peters AA, Monteith GR, Roberts-Thomson SJ. Plasma membrane calcium ATPase 4 and the remodeling of calcium homeostasis in human colon cancer cells. *Carcinogenesis*. 2009;30(11):1962-9.
- Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR. Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the brown Norway rat prostate. *Endocrinology*. 2001;142(9):4066-75.
- Beattie MC, Adekola L, Papadopoulos V, Chen H, Zirkin BR. Leydig cell aging and hypogonadism. *Experimental gerontology*. 2015;68:87-91.
- Begley LA, Kasina S, MacDonald J, Macoska JA. The inflammatory microenvironment of the aging prostate facilitates cellular proliferation and hypertrophy. *Cytokine*. 2008;43(2):194-9.
- Bergfors, T. M. Handling the Protein Sample. In: Bergfors, T. M. **Protein Crystallization**. 2. ed. La Jolla: International University Line, 2009. p. 267-292.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(7):517-29.
- Berry PA, Birnie R, Droop AP, Maitland NJ, Collins AT. The calcium sensor STIM1 is regulated by androgens in prostate stromal cells. *The Prostate*. 2011;71(15):1646-55.
- Bianco JJ, Handelsman DJ, Pedersen JS, Risbridger GP. Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. *Endocrinology*. 2002;143(12):4922-33.
- Blomberg Jensen M. Vitamin D and male reproduction. *Nature reviews Endocrinology*. 2014;10(3):175-86.
- Bonkhoff H, Stein U, Remberger K. The proliferative function of basal cells in the normal and hyperplastic human prostate. *The Prostate*. 1994;24(3):114-8.
- Bosland MC, Ford H, Horton L. Induction at high incidence of ductal prostate adenocarcinomas in NBL/Cr and Sprague-Dawley Hsd:SD rats treated with a combination of testosterone and estradiol-17 beta or diethylstilbestrol. *Carcinogenesis*. 1995;16(6):1311-7.
- Brandenburger T, Strehler EE, Filoteo AG, Caride AJ, Aumüller G, Post H, et al. Switch of PMCA4 splice variants in bovine epididymis results in altered isoform expression during functional sperm maturation. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(10):7938-46.
- Bruce JIE. PMCA. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. 2013.
- Burger PE, Xiong X, Coetzee S, Salm SN, Moscatelli D, Goto K, et al. Sca-1 expression identifies stem cells in the proximal region of prostatic ducts with high capacity to reconstitute prostatic tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(20):7180-5.
- Campolina-Silva GH, Maria BT, Mahecha GAB, Oliveira CA. Reduced vitamin D receptor (VDR) expression and plasma vitamin D levels are associated with aging-related prostate lesions. *The Prostate*. 2018;78(7):532-46.

- Campolina-Silva GH, Werneck-Gomes H, Maria BT, Barata MC, Torres MJ, Contreras HR, et al. Targeting Wistar rat as a model for studying benign, premalignant and malignant lesions of the prostate. *Life sciences*. 2020;242:117149.
- Carafoli E. Calcium pump of the plasma membrane. *Physiological reviews*. 1991;71(1):129-53.
- Christakos, S.; Mady, L. J.; Dhawan, P. Calbindin-D_{28k} and Calbindin-D_{9k} and the Epithelial Calcium Channels TRPV5 and TRPV6. In: Feldman, D. (Ed). **Vitamin D: Volume One: Biochemistry, Physiology and Diagnostics**. 4 ed. New York: Elsevier, 2018. p. 343-359.
- Christakos S, Hewison M, Gardner DG, Wagner CL, Sergeev IN, Rutten E, et al. Vitamin D: beyond bone. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013;1287:45-58.
- Colciago A, Ruscica M, Mornati O, Piccolella M, Montagnani-Marelli M, Eberini I, et al. In vitro chronic administration of ERbeta selective ligands and prostate cancer cell growth: hypotheses on the selective role of 3beta-adiol in AR-positive RV1 cells. *BioMed research international*. 2014;2014:801473.
- Creasy D, Bube A, de Rijk E, Kandori H, Kuwahara M, Masson R, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicologic pathology*. 2012;40(6 Suppl):40S-121S.
- Cridle RA, Zheng MH, Dick IM, Callus B, Prince RL. Estrogen responsiveness of renal calbindin-D28k gene expression in rat kidney. *Journal of cellular biochemistry*. 1997;65(3):340-8.
- Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrine reviews*. 1987;8(3):338-62.
- Cunha GR, Wang YZ, Hayward SW, Risbridger GP. Estrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. *Reproduction, fertility, and development*. 2001;13(4):285-96.
- Darwish H, Krisinger J, Furlow JD, Smith C, Murdoch FE, DeLuca HF. An estrogen-responsive element mediates the transcriptional regulation of calbindin D-9K gene in rat uterus. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(1):551-8.
- Darwish HM, DeLuca HF. Identification of a 1,25-dihydroxyvitamin D₃-response element in the 5'-flanking region of the rat calbindin D-9k gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(2):603-7.
- De Marzo AM, Haffner MC, Lotan TL, Yegnasubramanian S, Nelson WG. Premalignancy in Prostate Cancer: Rethinking What we Know. *Cancer prevention research*. 2016;9(8):648-56.
- De Marzo AM, Nelson WG, Meeker AK, Coffey DS. Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *The Journal of urology*. 1998;160(6 Pt 2):2381-92.
- De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(4):256-69.
- Delgado-Coello B, Mas-Oliva J. Relevance of the plasma membrane calcium-ATPase in the homeostasis of calcium in the fetal liver. *Organogenesis*. 2014;10(4):333-9.
- Déliot N, Constantin B. Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1848(10 Pt B):2512-22.
- den Dekker E, Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell calcium*. 2003;33(5-6):497-507.
- Dondi D, Piccolella M, Biserni A, Della Torre S, Ramachandran B, Locatelli A, et al. Estrogen receptor beta and the progression of prostate cancer: role of 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol. *Endocrine-related cancer*. 2010;17(3):731-42.
- Dowd DR, MacDonald PN, Komm BS, Haussler MR, Miesfeld RL. Stable expression of the calbindin-D28K complementary DNA interferes with the apoptotic pathway in lymphocytes. *Molecular endocrinology*. 1992;6(11):1843-8.
- Dubois C, Vanden Abeele F, Lehen'kyi V, Gkika D, Guarmit B, Lepage G, et al. Remodeling of channel-forming ORAI proteins determines an oncogenic switch in prostate cancer. *Cancer cell*. 2014;26(1):19-32.

- El-Alfy M, Pelletier G, Hermo LS, Labrie F. Unique features of the basal cells of human prostate epithelium. *Microscopy research and technique*. 2000;51(5):436-46.
- Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *The American journal of surgical pathology*. 2016;40(2):244-52.
- Filoteo AG, Elwess NL, Enyedi A, Caride A, Aung HH, Penniston JT. Plasma membrane Ca²⁺ pump in rat brain. Patterns of alternative splices seen by isoform-specific antibodies. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(38):23741-7.
- Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H. Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene*. 2003;22(49):7858-61.
- Fleet JC. The role of vitamin D in the endocrinology controlling calcium homeostasis. *Molecular and cellular endocrinology*. 2017;453:36-45.
- Friedman PA, Gesek FA. Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation. *Physiological reviews*. 1995;75(3):429-71.
- Galheigo MR, Cruz AR, Cabral AS, Faria PR, Cordeiro RS, Silva MJ, et al. Role of the TNF-alpha receptor type 1 on prostate carcinogenesis in knockout mice. *The Prostate*. 2016;76(10):917-26.
- Gao DY, Zhang BL, Leung MC, Au SC, Wong PY, Shum WW. Coupling of TRPV6 and TMEM16A in epithelial principal cells of the rat epididymis. *The Journal of general physiology*. 2016;148(2):161-82.
- García ME, Del Zotto H, Caride AJ, Filoteo AG, Penniston JT, Rossi JP, et al. Expression and cellular distribution pattern of plasma membrane calcium pump isoforms in rat pancreatic islets. *The Journal of membrane biology*. 2002;185(1):17-23.
- GeneCards. The human gene database. **Weizmann Institute of Science**, 2019. Disponível em: <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TRPV6#transcripts>>. Acesso em: 25 Janeiro 2020.
- Gonzaga ACR, Campolina-Silva GH, Werneck-Gomes H, Moura-Cordeiro JD, Santos LC, Mahecha GAB, et al. Profile of cell proliferation and apoptosis activated by the intrinsic and extrinsic pathways in the prostate of aging rats. *The Prostate*. 2017;77(9):937-48.
- Guerini V, Sau D, Scaccianoce E, Rusmini P, Ciana P, Maggi A, et al. The androgen derivative 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol inhibits prostate cancer cell migration through activation of the estrogen receptor beta subtype. *Cancer research*. 2005;65(12):5445-53.
- Haffner MC, Weier C, Xu MM, Vaghasia A, Gurel B, Gumuskaya B, et al. Molecular evidence that invasive adenocarcinoma can mimic prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and intraductal carcinoma through retrograde glandular colonization. *The Journal of pathology*. 2016;238(1):31-41.
- Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1998;13(3):325-49.
- Hayashi N, Sugimura Y, Kawamura J, Donjacour AA, Cunha GR. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biology of reproduction*. 1991;45(2):308-21.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, et al. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta anatomica*. 1996b;155(2):81-93.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R, et al. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta anatomica*. 1996c;155(2):94-103.
- Hayward SW, Brody JR, Cunha GR. An edgewise look at basal epithelial cells: three-dimensional views of the rat prostate, mammary gland and salivary gland. *Differentiation; research in biological diversity*. 1996a;60(4):219-27.
- Hirnet D, Olausson J, Fecher-Trost C, Bodding M, Nastainczyk W, Wissenbach U, et al. The TRPV6 gene, cDNA and protein. *Cell calcium*. 2003;33(5-6):509-18.

- Hoenderop JG, Muller D, Van Der Kemp AW, Hartog A, Suzuki M, Ishibashi K, et al. Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2001;12(7):1342-9.
- Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. Calcium absorption across epithelia. *Physiological reviews*. 2005;85(1):373-422.
- Hoenderop JG, Willems PH, Bindels RJ. Toward a comprehensive molecular model of active calcium reabsorption. *American journal of physiology Renal physiology*. 2000;278(3):F352-60.
- Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(3):362-71.
- Holzmann C, Kilch T, Kappel S, Dorr K, Jung V, Stockle M, et al. Differential Redox Regulation of Ca(2)(+) Signaling and Viability in Normal and Malignant Prostate Cells. *Biophysical journal*. 2015;109(7):1410-9.
- Howard A, Barley NF, Legon S, Walters JR. Plasma-membrane calcium-pump isoforms in human and rat liver. *The Biochemical journal*. 1994;303 (Pt 1):275-9.
- Huang Z, Fan G, Wang D. Downregulation of calbindin 1, a calcium-binding protein, reduces the proliferation of osteosarcoma cells. *Oncology letters*. 2017;13(5):3727-33.
- Huggins C, Scott WW, Heinen H. Chemical Composition of Human Semen and of the Secretions of the Prostate and Seminal Vesicles. *American Journal of Physiology*. 1942;136(3):467-73.
- Imamov O, Morani A, Shim GJ, Omoto Y, Thulin-Andersson C, Warner M, et al. Estrogen receptor beta regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(25):9375-80.
- INCA. Incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde**, 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 25 Janeiro 2020.
- Inpanbutr N, Taylor AN. Expression of calbindin-D28k in developing and growing chick testes. *Histochemistry*. 1992;97(4):335-9.
- Islam, M. S. The Regulation of a Cell's Ca²⁺ Signaling Toolkit: The Ca²⁺ Homeostosome. In: Islam, M. S. **Calcium Signaling**. Uppsala: Springer, 2012. p. 15-39.
- Ittmann M, Huang J, Radaelli E, Martin P, Signoretti S, Sullivan R, et al. Animal models of human prostate cancer: the consensus report of the New York meeting of the Mouse Models of Human Cancers Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer research*. 2013;73(9):2718-36.
- Jin C, Lin T, Shan L. Downregulation of Calbindin 1 by miR-454-3p Suppresses Cell Proliferation in Nonsmall Cell Lung Cancer In Vitro. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*. 2019;34(2):119-27.
- Jin L, Miyamoto O, Toyoshima T, Kobayashi R, Murakami TH, Itano T. Localization of calbindin-D28k in normal and incised mouse skin: immunohistochemical and immunoblot analysis. *Archives of dermatological research*. 1997;289(10):578-84.
- Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Kumar R. Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in rat reproductive tissues. *Histochemistry and cell biology*. 1996;105(1):7-15.
- Jung EM, Choi KC, Jeung EB. Expression of calbindin-D28k is inversely correlated with proapoptotic gene expression in hydrogen peroxide-induced cell death in endometrial cancer cells. *International journal of oncology*. 2011;38(4):1059-66.
- Kavanagh JP. Sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, citrate and chloride content of human prostatic and seminal fluid. *Journal of reproduction and fertility*. 1985;75(1):35-41.
- Kavanagh JP, Darby C. The interrelationships between acid phosphatase, aminopeptidase, diamine oxidase, citric acid, beta-glucuronidase, pH and zinc in human prostatic fluid. *International journal of andrology*. 1982;5(5):503-12.
- Kip SN, Strehler EE. Rapid downregulation of NCX and PMCA in hippocampal neurons following H₂O₂ oxidative stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1099:436-9.

- Kojetin DJ, Venters RA, Kordys DR, Thompson RJ, Kumar R, Cavanagh J. Structure, binding interface and hydrophobic transitions of Ca²⁺-loaded calbindin-D(28K). *Nature structural & molecular biology*. 2006;13(7):641-7.
- Kumar VL, Majumder PK. Prostate gland: structure, functions and regulation. *International urology and nephrology*. 1995;27(3):231-43.
- Kwon OJ, Zhang L, Ittmann MM, Xin L. Prostatic inflammation enhances basal-to-luminal differentiation and accelerates initiation of prostate cancer with a basal cell origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(5):E592-600.
- Laczko I, Hudson DL, Freeman A, Feneley MR, Masters JR. Comparison of the zones of the human prostate with the seminal vesicle: morphology, immunohistochemistry, and cell kinetics. *The Prostate*. 2005;62(3):260-6.
- Lawson DA, Xin L, Lukacs RU, Cheng D, Witte ON. Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(1):181-6.
- Le Magnen C, Virk RK, Dutta A, Kim JY, Panja S, Lopez-Bujanda ZA, et al. Cooperation of loss of NKX3.1 and inflammation in prostate cancer initiation. *Disease models & mechanisms*. 2018;11(11).
- Leach DA, Need EF, Toivanen R, Trotta AP, Palethorpe HM, Tamblyn DJ, et al. Stromal androgen receptor regulates the composition of the microenvironment to influence prostate cancer outcome. *Oncotarget*. 2015;6(18):16135-50.
- Lee BM, Lee GS, Jung EM, Choi KC, Jeung EB. Uterine and placental expression of TRPV6 gene is regulated via progesterone receptor- or estrogen receptor-mediated pathways during pregnancy in rodents. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2009;7:49.
- Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2011;40(3):565-75, viii-ix.
- Lee DK, Liu Y, Liao L, Wang F, Xu J. The prostate basal cell (BC) heterogeneity and the p63-positive BC differentiation spectrum in mice. *International journal of biological sciences*. 2014;10(9):1007-17.
- Lee ES, Son DS, Kim SH, Lee J, Jo J, Han J, et al. Prediction of recurrence-free survival in postoperative non-small cell lung cancer patients by using an integrated model of clinical information and gene expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(22):7397-404.
- Lee WJ, Roberts-Thomson SJ, Holman NA, May FJ, Lehrbach GM, Monteith GR. Expression of plasma membrane calcium pump isoform mRNAs in breast cancer cell lines. *Cellular signalling*. 2002;14(12):1015-22.
- Lee WJ, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR. Plasma membrane calcium-ATPase 2 and 4 in human breast cancer cell lines. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;337(3):779-83.
- Lehen'kyi V, Flourakis M, Skryma R, Prevarskaya N. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene*. 2007;26(52):7380-5.
- Lehen'kyi V, Raphael M, Oulidi A, Flourakis M, Khalimonchik S, Kondratskyi A, et al. TRPV6 determines the effect of vitamin D3 on prostate cancer cell growth. *PloS one*. 2011;6(2):e16856.
- Lehen'kyi V, Raphael M, Prevarskaya N. The role of the TRPV6 channel in cancer. *The Journal of physiology*. 2012;590(6):1369-76.
- Leman ES, Arlotti JA, Dhir R, Getzenberg RH. Vitamin D and androgen regulation of prostatic growth. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;90(1):138-47.
- Li YC, Pirro AE, Demay MB. Analysis of vitamin D-dependent calcium-binding protein messenger ribonucleic acid expression in mice lacking the vitamin D receptor. *Endocrinology*. 1998;139(3):847-51.
- Li Z, Meng Z, Lu J, Chen FM, Wong WT, Tse G, et al. TRPV6 protects ER stress-induced apoptosis via ATF6alpha-TRPV6-JNK pathway in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2018;120:1-11.

- Liu X, Grogan TR, Hieronymus H, Hashimoto T, Mottahedeh J, Cheng D, et al. Low CD38 Identifies Progenitor-like Inflammation-Associated Luminal Cells that Can Initiate Human Prostate Cancer and Predict Poor Outcome. *Cell reports*. 2016;17(10):2596-606.
- Loffing J, Loffing-Cueni D, Valderrabano V, Klausli L, Hebert SC, Rossier BC, et al. Distribution of transcellular calcium and sodium transport pathways along mouse distal nephron. *American journal of physiology Renal physiology*. 2001;281(6):F1021-7.
- Lytton J. Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *The Biochemical journal*. 2007;406(3):365-82.
- Mak P, Leav I, Pursell B, Bae D, Yang X, Taglienti CA, et al. ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1 alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading. *Cancer cell*. 2010;17(4):319-32.
- Matzkin H, Soloway MS. Immunohistochemical evidence of the existence and localization of aromatase in human prostatic tissues. *The Prostate*. 1992;21(4):309-14.
- McNeal JE. Normal histology of the prostate. *The American journal of surgical pathology*. 1988;12(8):619-33.
- Meng X, Brachova P, Yang S, Xiong Z, Zhang Y, Thiel KW, et al. Knockdown of MTDH sensitizes endometrial cancer cells to cell death induction by death receptor ligand TRAIL and HDAC inhibitor LBH589 co-treatment. *PloS one*. 2011;6(6):e20920.
- Minelli A, Bellezza I, Conte C, Culig Z. Oxidative stress-related aging: A role for prostate cancer? *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1795(2):83-91.
- Moad M, Hannezo E, Buczacki SJ, Wilson L, El-Sherif A, Sims D, et al. Multipotent Basal Stem Cells, Maintained in Localized Proximal Niches, Support Directed Long-Ranging Epithelial Flows in Human Prostates. *Cell reports*. 2017;20(7):1609-22.
- Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM, Roberts-Thomson SJ. Calcium and cancer: targeting Ca²⁺ transport. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(7):519-30.
- Morais-Santos M, Nunes AE, Oliveira AG, Moura-Cordeiro JD, Mahecha GA, Avellar MC, et al. Changes in Estrogen Receptor ERbeta (ESR2) Expression without Changes in the Estradiol Levels in the Prostate of Aging Rats. *PloS one*. 2015;10(7):e0131901.
- Morais-Santos M, Werneck-Gomes H, Campolina-Silva GH, Santos LC, Mahecha GAB, Hess RA, et al. Basal Cells Show Increased Expression of Aromatase and Estrogen Receptor alpha in Prostate Epithelial Lesions of Male Aging Rats. *Endocrinology*. 2018;159(2):723-32.
- Na, T.; Peng, J. B. TRPV5: A Ca²⁺ Channel for the Fine-Tuning of Ca²⁺ Reabsorption. In: Nilius, B. & Flockerzi, V. **Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels**. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 2014. p. 321-357.
- Nickel JC, Downey J, Young I, Boag S. Asymptomatic inflammation and/or infection in benign prostatic hyperplasia. *BJU international*. 1999;84(9):976-81.
- Nijenhuis T, Hoenderop JG, van der Kemp AW, Bindels RJ. Localization and regulation of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV6 in the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2003;14(11):2731-40.
- Nilius B, Szallasi A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacological reviews*. 2014;66(3):676-814.
- Okura Y, Ishii K, Kanda H, Kanai M, Arima K, Wang Y, et al. Bisphenol A induces permanent squamous change in mouse prostatic epithelium. *Differentiation; research in biological diversity*. 2007;75(8):745-56.
- Okunade GW, Miller ML, Pyne GJ, Sutliff RL, O'Connor KT, Neumann JC, et al. Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(32):33742-50.
- Oliveira AG, Aquino DJ, Mahecha GA, Oliveira CA. Involvement of the transepithelial calcium transport disruption and the formation of epididymal stones in roosters. *Reproduction*. 2012;143(6):835-44.

OMS. Cancer Today. **International Agency for Research on Cancer, World Health Organization**, 2018. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today>>. Acesso em: 25 Janeiro 2020.

Öz OK, Hajibeigi A, Howard K, Cummins CL, van Abel M, Bindels RJ, et al. Aromatase deficiency causes altered expression of molecules critical for calcium reabsorption in the kidneys of female mice *. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2007;22(12):1893-902.

Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1863(6 Pt A):1238-60.

Park JH, Walls JE, Galvez JJ, Kim M, Abate-Shen C, Shen MM, et al. Prostatic intraepithelial neoplasia in genetically engineered mice. *The American journal of pathology*. 2002;161(2):727-35.

Passeri G, Vescovini R, Sansoni P, Galli C, Franceschi C, Passeri M, et al. Calcium metabolism and vitamin D in the extreme longevity. *Experimental gerontology*. 2008;43(2):79-87.

Peehl DM, Skowronski RJ, Leung GK, Wong ST, Stamey TA, Feldman D. Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on primary cultures of human prostatic cells. *Cancer research*. 1994;54(3):805-10.

Pelc K, Vincent S, Ruchoux MM, Kiss R, Pochet R, Sariban E, et al. Calbindin-d(28k): a marker of recurrence for medulloblastomas. *Cancer*. 2002;95(2):410-9.

Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Weremowicz S, Morton CC, Vassilev PM, et al. Human calcium transport protein CaT1. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;278(2):326-32.

Peng JB, Zhuang L, Berger UV, Adam RM, Williams BJ, Brown EM, et al. CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;282(3):729-34.

Pollard M. Spontaneous prostate adenocarcinomas in aged germfree Wistar rats. *Journal of the National Cancer Institute*. 1973;51(4):1235-41.

Post H, Gutberlet J, Wiche R, Aumuller G, Wilhelm B. The localization of PMCA1b in epithelial cells and aposomes of the rat coagulating gland is influenced by androgens. *The Prostate*. 2008;68(10):1076-85.

Prins GS, Korach KS. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids*. 2008;73(3):233-44.

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

Puhr M, De Marzo A, Isaacs W, Lucia MS, Sfanos K, Yegnasubramanian S, et al. Inflammation, Microbiota, and Prostate Cancer. *European urology focus*. 2016;2(4):374-82.

Ramasamy I. Recent advances in physiological calcium homeostasis. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2006;44(3):237-73.

Raphaël M, Lehen'kyi V, Vandenberghe M, Beck B, Khalimonchik S, Vanden Abeele F, et al. TRPV6 calcium channel translocates to the plasma membrane via Orai1-mediated mechanism and controls cancer cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(37):E3870-9.

Reinhardt TA, Filoteo AG, Penniston JT, Horst RL. Ca(2+)-ATPase protein expression in mammary tissue. *American journal of physiology Cell physiology*. 2000;279(5):C1595-602.

Reisner PD, Christakos S, Vanaman TC. In vitro enzyme activation with calbindin-D28k, the vitamin D-dependent 28 kDa calcium binding protein. *FEBS letters*. 1992;297(1-2):127-31.

Ricke WA, McPherson SJ, Bianco JJ, Cunha GR, Wang Y, Risbridger GP. Prostatic hormonal carcinogenesis is mediated by in situ estrogen production and estrogen receptor alpha signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22(5):1512-20.

Risbridger, G. P.; Taylor, R. A. Physiology of the Male Accessory Sex Structures: The Prostate Gland, Seminal Vesicles, and Bulbourethral Glands. In: Jimmy, D. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3. ed. New York: Elsevier, 2006. p. 1149-1172.

- Risbridger G, Wang H, Young P, Kurita T, Wang YZ, Lubahn D, et al. Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor- α mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Developmental biology*. 2001b;229(2):432-42.
- Risbridger GP, Bianco JJ, Ellem SJ, McPherson SJ. Oestrogens and prostate cancer. *Endocrine-related cancer*. 2003;10(2):187-91.
- Risbridger GP, Wang H, Frydenberg M, Cunha G. The metaplastic effects of estrogen on mouse prostate epithelium: proliferation of cells with basal cell phenotype. *Endocrinology*. 2001a;142(6):2443-50.
- Robinson B, Magi-Galluzzi C, Zhou M. Intraductal carcinoma of the prostate. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2012;136(4):418-25.
- SBOC. Câncer de Próstata. Diretrizes da **Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica**, 2017. Disponível em: <https://sboc.org.br/images/diretrizes/diretrizes_pdfs/Cancer_de_prostata.pdf>. Acesso em: 25 Janeiro 2020.
- Saito K, Uzawa K, Endo Y, Kato Y, Nakashima D, Ogawara K, et al. Plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform 1 down-regulated in human oral cancer. *Oncology reports*. 2006;15(1):49-55.
- Schwab BL, Guerini D, Didszun C, Bano D, Ferrando-May E, Fava E, et al. Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. *Cell death and differentiation*. 2002;9(8):818-31.
- Schwarz EC, Wissenbach U, Niemeyer BA, Strauss B, Philipp SE, Flockerzi V, et al. TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation. *Cell calcium*. 2006;39(2):163-73.
- Seuter S, Neme A, Carlberg C. Characterization of genomic vitamin D receptor binding sites through chromatin looping and opening. *PloS one*. 2014;9(4):e96184.
- Sfanos KS, Yegnasubramanian S, Nelson WG, De Marzo AM. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. *Nature reviews Urology*. 2018;15(1):11-24.
- Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, et al. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer research*. 2004;64(6):2270-305.
- Shum WW, Da Silva N, McKee M, Smith PJ, Brown D, Breton S. Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell*. 2008;135(6):1108-17.
- Skrzypski M, Khajavi N, Mergler S, Szczepankiewicz D, Kolodziejski PA, Metzke D, et al. TRPV6 channel modulates proliferation of insulin secreting INS-1E beta cell line. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1853(12):3202-10.
- Soeffing WJ, Timms BG. Localization of androgen receptor and cell-specific cytokeratins in basal cells of rat ventral prostate. *Journal of andrology*. 1995;16(3):197-208.
- Stauffer TP, Hilfiker H, Carafoli E, Strehler EE. Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(34):25993-6003.
- Stoyanova T, Cooper AR, Drake JM, Liu X, Armstrong AJ, Pienta KJ, et al. Prostate cancer originating in basal cells progresses to adenocarcinoma propagated by luminal-like cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(50):20111-6.
- Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(16):6062-7.
- Suwa T, Nyska A, Peckham JC, Hailey JR, Mahler JF, Haseman JK, et al. A retrospective analysis of background lesions and tissue accountability for male accessory sex organs in Fischer-344 rats. *Toxicologic pathology*. 2001;29(4):467-78.
- Takase Y, Levesque MH, Luu-The V, El-Alfy M, Labrie F, Pelletier G. Expression of enzymes involved in estrogen metabolism in human prostate. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2006;54(8):911-21.

- Tan HL, Haffner MC, Esopi DM, Vaghasia AM, Giannico GA, Ross HM, et al. Prostate adenocarcinomas aberrantly expressing p63 are molecularly distinct from usual-type prostatic adenocarcinomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2015;28(3):446-56.
- Taylor SC, Berkelman T, Yadav G, Hammond M. A defined methodology for reliable quantification of Western blot data. *Molecular biotechnology.* 2013;55(3):217-26.
- Timms BG, Chandler JA, Sinowatz F. The ultrastructure of basal cells of rat and dog prostate. *Cell and tissue research.* 1976;173(4):543-54.
- Toivanen R, Mohan A, Shen MM. Basal Progenitors Contribute to Repair of the Prostate Epithelium Following Induced Luminal Anoikis. *Stem cell reports.* 2016;6(5):660-7.
- Torres A, Alshalalfa M, Davicioni E, Gupta A, Yegnasubramanian S, Wheelan SJ, et al. ETS2 is a prostate basal cell marker and is highly expressed in prostate cancers aberrantly expressing p63. *The Prostate.* 2018;78(12):896-904.
- Trump DL, Deeb KK, Johnson CS. Vitamin D: considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy. *Cancer journal.* 2010;16(1):1-9.
- Tsigelny I, Shindyalov IN, Bourne PE, Sudhof TC, Taylor P. Common EF-hand motifs in cholinesterases and neurologins suggest a role for Ca²⁺ binding in cell surface associations. *Protein science : a publication of the Protein Society.* 2000;9(1):180-5.
- Tsujimura A, Koikawa Y, Salm S, Takao T, Coetzee S, Moscatelli D, et al. Proximal location of mouse prostate epithelial stem cells: a model of prostatic homeostasis. *The Journal of cell biology.* 2002;157(7):1257-65.
- Van Abel M, Hoenderop JG, Dardenne O, St Arnaud R, Van Os CH, Van Leeuwen HJ, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3)-independent stimulatory effect of estrogen on the expression of ECaC1 in the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2002;13(8):2102-9.
- van de Graaf SF, Hoenderop JG, Gkika D, Lamers D, Prenen J, Rescher U, et al. Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *The EMBO journal.* 2003;22(7):1478-87.
- VanHouten J, Sullivan C, Bazinet C, Ryoo T, Camp R, Rimm DL, et al. PMCA2 regulates apoptosis during mammary gland involution and predicts outcome in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(25):11405-10.
- Vaz CV, Marques R, Maia CJ, Socorro S. Aging-associated changes in oxidative stress, cell proliferation, and apoptosis are prevented in the prostate of transgenic rats overexpressing regucalcin. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine.* 2015;166(6):693-705.
- Wang J, Zhu HH, Chu M, Liu Y, Zhang C, Liu G, et al. Symmetrical and asymmetrical division analysis provides evidence for a hierarchy of prostate epithelial cell lineages. *Nature communications.* 2014;5:4758.
- Watanabe H, Imaizumi M, Ojika T, Abe T, Hida T, Kato K. Evaluation of biological characteristics of lung cancer by the human 28 kDa vitamin D-dependent calcium binding protein, calbindin-D28k. *Japanese journal of clinical oncology.* 1994;24(3):121-7.
- Weber K, Erben RG, Rump A, Adamski J. Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels ECaC1 and 2. *Biochemical and biophysical research communications.* 2001;289(5):1287-94.
- Weihua Z, Lathe R, Warner M, Gustafsson JA. An endocrine pathway in the prostate, ERbeta, AR, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol, and CYP7B1, regulates prostate growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002;99(21):13589-94.
- Wilhelm B, Brandenburger T, Post H, Aumuller G. Expression and localization of PMCA4 in rat testis and epididymis. *Histochemistry and cell biology.* 2008;129(3):331-43.
- Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalie A, et al. Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(22):19461-8.

Wolf A, Wennemuth G. Ca²⁺ clearance mechanisms in cancer cell lines and stromal cells of the prostate. *The Prostate*. 2014;74(1):29-40.

Wright AS, Thomas LN, Douglas RC, Lazier CB, Rittmaster RS. Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of the castrated rat. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98(11):2558-63.

Xie W, Wong YC, Tsao SW. Correlation of increased apoptosis and proliferation with development of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in ventral prostate of the Noble rat. *The Prostate*. 2000;44(1):31-9.

Yan Y, Wei CL, Zhang WR, Cheng HP, Liu J. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta pharmacologica Sinica*. 2006;27(7):821-6.

Yang H, Choi KC, Hyun SH, Jeung EB. Coexpression and estrogen-mediated regulation of TRPV6 and PMCA1 in the human endometrium during the menstrual cycle. *Molecular reproduction and development*. 2011;78(4):274-82.

Yang H, Choi KC, Hyun SH, Jeung EB. Coexpression and estrogen-mediated regulation of TRPV6 and PMCA1 in the human endometrium during the menstrual cycle. *Molecular reproduction and development*. 2011;78(4):274-82.

Young, R. H. *et al.* Carcinoma of the Prostate Gland. In: Young, R. H. *et al.* **Tumors of the Prostate Gland, Seminal Vesicles, Male Urethra, and Penis**. Third series, Fascicle 28. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 2000. p. 111-199.

Zhang W, Na T, Wu G, Jing H, Peng JB. Down-regulation of intestinal apical calcium entry channel TRPV6 by ubiquitin E3 ligase Nedd4-2. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(47):36586-96.

Zhuang L, Peng JB, Tou L, Takanaga H, Adam RM, Hediger MA, et al. Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2002;82(12):1755-64.