



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**Ações da vitamina D na regulação da Regucalcina
no cancro da próstata
(Versão Final Após Defesa)**

Ana Margarida Pereira Rodrigues

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Cláudio Maia
Co-orientadora: Prof^a. Doutora Sílvia Socorro

Covilhã, julho de 2019

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. Cláudio Maia, pela sua orientação, ensinamentos, disponibilidade, dedicação e pelas opiniões e críticas na realização da minha dissertação de tese. Agradeço também à minha co-orientadora Prof. Dr^a. Sílvia Socorro pela ajuda e disponibilidade do seu laboratório.

Agradeço à Mestre Sandra Rocha por me ter ensinado tudo para que esta dissertação fosse possível e também pelo apoio e carinho durante este ano letivo.

Aos meus pais, Pedro e Lídia e ao meu irmão Diogo pelas palavras de incentivo e encorajamento valorizando sempre o meu potencial, nos momentos mais difíceis. Sem vocês, não teria esta oportunidade de lutar pelos meus sonhos e objetivos.

Ao meu namorado, Fábio, agradeço por acreditar em mim e naquilo que sou capaz. Obrigada por estares sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos, pelo o amor, honestidade e companheirismo nesta fase da minha vida.

A minha profunda gratidão aos meus grandes amigos, Catarina, Raquel e Rui por estarem sempre ao meu lado quando mais necessitava, sem vocês não teria tido a mesma força de vontade, obrigada pelo apoio e nunca vos irei esquecer. Agradeço também aos meus restantes amigos, principalmente à Lara, Rodrigo, Joana e Roberta que estiveram comigo e mostraram a grande amizade ao longo deste ano.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Manuela, Joana e Vanessa agradeço pela companhia, pelas palavras e pela ajuda ao longo deste ano letivo.

Muito obrigado!

Resumo

Cancro da próstata é o segundo cancro maligno mais diagnosticado na população masculina. Baixos níveis de vitamina D tem sido associados ao desenvolvimento e/ou progressão do cancro da próstata. Vitamina D pode ser produzida na pele, durante a exposição solar, ou provinda da dieta. Calcitriol, a forma ativa da vitamina D, quando ligada ao seu recetor, regula a expressão de uma variedade de genes que estão associados com a homeostase do cálcio e também associados ao crescimento celular, diferenciação e apoptose. Esta hormona é então um regulador da homeostase de cálcio intracelular, mas também um modulador efetivo da proliferação celular e da diferenciação em diferentes tipos de células, como é o caso do cancro da próstata. O desequilíbrio entre a morte celular e a proliferação, está na base da carcinogénese e a transformação maligna das células tem sido associada a alterações na sinalização de cálcio. Regucalcina é uma proteína que tem como papel importante na manutenção da homeostase de cálcio e também na regulação da expressão de algumas proteínas importantes nas vias de sinalização intracelular. Estudos do nosso grupo comprovam que a regucalcina está subexpressa no cancro da próstata. Este projeto de investigação tem como objetivo verificar o efeito anticancerígeno da vitamina D através da regulação da regucalcina. Para isso, utilizou-se a técnica de PCR em tempo real para avaliar a expressão da regucalcina nas células PNT1A, LnCap e PC3 estimuladas com a vitamina D. Nos resultados obtidos, nas linhas PNT1A e LnCaP observou-se uma diminuição significativa da expressão do mRNA regucalcina enquanto que na linha PC-3 houve um aumento da expressão. Concluímos que possivelmente a vitamina D tem ações anticancerígenas apenas em estados tardios do cancro da próstata, aumentando a expressão da regucalcina e assim regredir a progressão do cancro.

Palavras-chave

Cálcio, Cancro da próstata, Recetor da Vitamina D, Regucalcina, SMP30, Vitamina D

Abstract

Prostate cancer is the second most commonly diagnosed cancer in the male population. Low levels of vitamin D are associated with the development and/or progression of prostate cancer. Vitamin D can be produced in the skin, during the sun exposure or ingested in diet. Calcitriol, the active form of vitamin D, when linked to its receptor, regulates the expression of dozens of genes whose action is associated with calcium homeostasis as well as cellular growth, differentiation and apoptosis. As so, this hormone is a regulator of calcium homeostasis but also an effective modulator of cellular proliferation and differentiation in a different cell types, including prostate cancer. The disequilibrium in cell death and proliferation is on the basis of carcinogenesis, and the malignant transformation of cells has been associated with alterations in calcium signaling. Regucalcin is a protein that plays an important role in the maintenance of intracellular calcium homeostasis as well as regulating the expression of several important proteins of intracellular signaling pathways. Studies of our group show that regucalcina is underexpress in prostate cancer. This project's objective is to check if there are any anti-cancer effects of vitamin D mediated by regucalcin. For that, we will use the qPCR method to evaluate the expression of regucalcin in PNT1A, LnCap and PC3, after being stimulated with vitamin D. The results showed a significant decrease of regucalcin mRNA expression and in PNT1A and LNCaP cells, but in PC-3 cells an increase of regucalcin expression was observed. The results suggest that vitamin D has anticancer actions only in late stages of prostate cancer, by increasing the expression of regucalcin, and therefore, inhibiting the cancer progression.

Keywords

Calcium, Prostate cancer, Regucalcin, SPM30, Vitamin D, Vitamina D receptor

Índice

1. Introdução	2
1.1. Próstata	2
1.1.1. Anatomia e fisiologia da próstata	2
1.1.2. Carcinogénese/patofisiologia	3
1.1.3. Alterações genéticas	9
1.2. Vitamina D	11
1.2.1. Síntese e Metabolismo da Vitamina D ₃	11
1.2.2. Mecanismo de ação da 1,25(OH) ₂ D	13
1.2.3. Vitamina D e Cancro da próstata	13
1.2.4. Papel do cálcio no cancro da próstata	15
1.3. Regucalcina	17
1.3.1. Propriedades, expressão e regulação da Regucalcina	18
1.3.2. Funções da Regucalcina	19
1.3.3. Regucalcina e o Cancro da próstata	20
2. Objetivos	22
3. Materiais e métodos	24
3.1. Cultura de Células e tratamento	24
3.2. Extração de RNA total e síntese de cDNA	24
3.3. PCR em tempo real	25
3.4. Análise estatística	26
4. Resultados e discussão	28
4.1. Extração de RNA total das linhas celulares	28

4.2.	Avaliação do efeito da modulação pela vitamina D na expressão da regucalcina em linhas celulares da próstata humana.....	30
5.	Conclusões e perspectivas futuras.....	34
6.	Referências Bibliográficas	36

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da histologia de acino do tecido prostático.	2
Figura 2 - Representação da próstata humana e as diferentes zonas que a constituem.	3
Figura 3 - Processos de transformação e de fenótipos dos estados pré-malignos do cancro da próstata.....	5
Figura 4 - O diagrama original do sistema Gleason Score.	7
Figura 5 - Esquema ilustrativo da ação dos androgénios na próstata.....	8
Figura 6 - Biologia Molecular do CPRC.	9
Figura 7 - Representação esquemática da via de metabolização da vitamina D.	12
Figura 8- Rede de sinalização de Ca^{2+} a nível celular.	16
Figura 9 - Estrutura cristalina da regucalcina com ligação ao cálcio.	18
Figura 10 - Representação esquemática dos mecanismos envolvidos no papel da regucalcina (RGN) controlando a proliferação celular e a apoptose.	19
Figura 11 - Representação esquemática do trabalho experimental desde da cultura de células até ao qPCR.....	24
Figura 12 - Representação de resultados de eletroforese em gel e correspondência das subunidades ás bandas.....	28
Figura 13 - Imagens de confirmação da integridade de RNA, por eletroforese em gel de agarose.. ..	29
Figura 14 - Efeitos da vitamina D na expressão da RGN em PNT1A.	30
Figura 15 - Efeitos da vitamina D na expressão da RGN em LnCap.	31
Figura 16 - Efeitos da vitamina D na expressão da RGN em PC-3.	32

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Propriedades anticancerígenas da Vitamina D e respetivos genes alvo. 14

Lista de Acrónimos

7-DHC	7-dehidrocolesterol
cDNA	DNA complementar
Ch	<i>Charcoal Stripped Fetal Bovine Serum</i>
CPRC	Cancro da próstata resistente à castração
DBP	<i>Vitamin D binding protein</i>
DHT	Di-hidrotosterona
DAG	Diacilglicerol
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF23	Fator de crescimento fibroblástico 23
GSTP1	Glutathione S-transferase P1
HPB	Hiperplasia prostática benigna
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IP3	Inositol-1,4,5-trisfosfato
PIA	Atrofia proliferativa inflamatória
PIP2	4,5-bisfosfato de fosfatidinositol
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática
PKC	Proteína cinase C
PLC	Enzima fosfolipase C
PSA	Antigénio específico da próstata
PTH	Hormona da paratiroide
RA	Recetor de Androgénio
RGN	Regucalcina
RIPA (tampão)	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SPM30	<i>Senescence Marker Protein-30</i>
VDR	Recetor da vitamina D

Capítulo I

1. Introdução

1.1. Próstata

1.1.1. Anatomia e fisiologia da próstata

A próstata humana é um órgão acessório sexual que existe apenas no sexo masculino e é definido como uma glândula exócrina. No momento da ejaculação, liberta secreções alcalinas na uretra prostática, sendo misturadas com a suspensão fluida de espermatozoides, funcionando como suporte a estes (Fishman 1987).

A próstata adulta é um órgão parcialmente glandular e muscular, localizado abaixo da bexiga, ao redor do início da uretra, e anterior ao reto. Tem um tamanho de uma noz em forma de um cone invertido, e ronda os 28-47 cm² de volume e 20g de peso, podendo estes últimos dois fatores variar com a idade (Aaron et al. 2016; Bosch et al. 2007; Dunn & Kazer 2011; Lee et al. 2011).

A próstata, vista numa forma histológica, é formada por vários tipos de células: células luminares, células basais, sendo estes dois tipos de células a base do epitélio, células estaminais, células do estroma fibromuscular, vasculatura endotelial e uma variedade de células imunes (Packer & Maitland 2016).

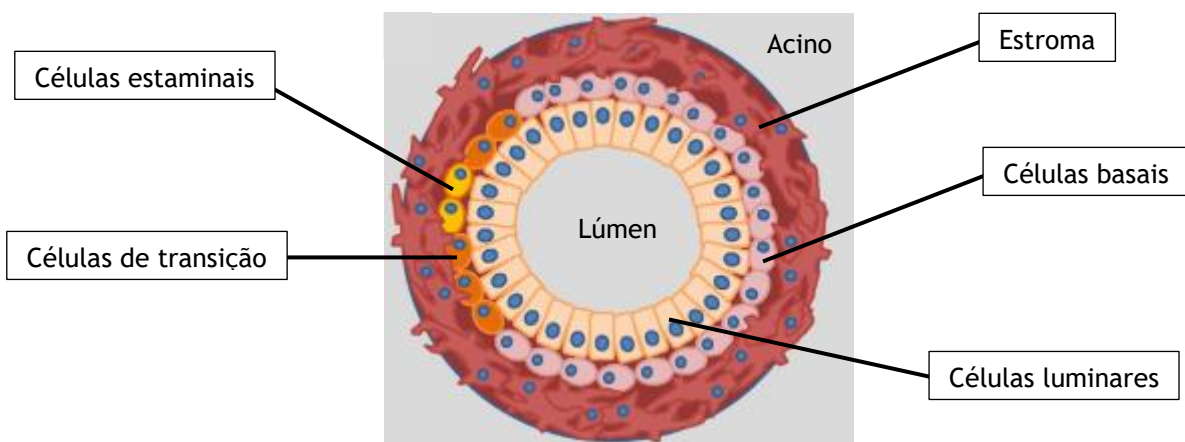


Figura 1 - Representação esquemática da histologia de acino do tecido prostático (Packer & Maitland 2016).

McNeal *et al* (1981) demonstrou que a próstata humana é uma glândula não homogénea, composta por quatro zonas, representadas na figura 2. As zonas foram classificadas como: zona de transição, região que rodeia a uretra, provinda da bexiga; zona central, que rodeia os canais ejaculadores e estabelece a ligação das vesículas seminais à próstata; zona periférica, que envolve estas duas últimas zonas e canais, correspondendo a 70% da próstata normal, e é onde os tumores preferencialmente se desenvolvem (Fishman 1987); e por último, zona fibromuscular anterior, composta por tecido fibroso e muscular, sendo a única região não glandular. Estas zonas são a constituição interna da próstata e estão envolvidas por um tecido fibromuscular, cápsula prostática, que compõe a parte externa da próstata (McNeal JE, Stamey

TA 1988; McNeal 1984). Para além destas zonas, *McNeal* (1972) caracterizou a uretra prostática. A uretra prostática é parte inicial da uretra que está envolvida pela próstata. Na parte dorsal da uretra prostática, existe uma saliência para o seu interior, denominada de *verumontanum*. No ápice desta saliência, abre-se um tubo cego, sem função conhecida, o utrículo prostático. Nos lados do *verumontanum* e abaixo do utrículo prostático, abrem-se dois ductos ejaculadores, pelos quais passa espermatozoides e secreções de outras glândulas acessórias. Resumindo, é então na uretra prostática que ocorre a mistura entre todas as secreções das glândulas acessórias e espermatozoides provenientes dos testículos, formando assim o sêmen. A uretra tem a função de transportar urina e sêmen para fora do corpo através do pénis.

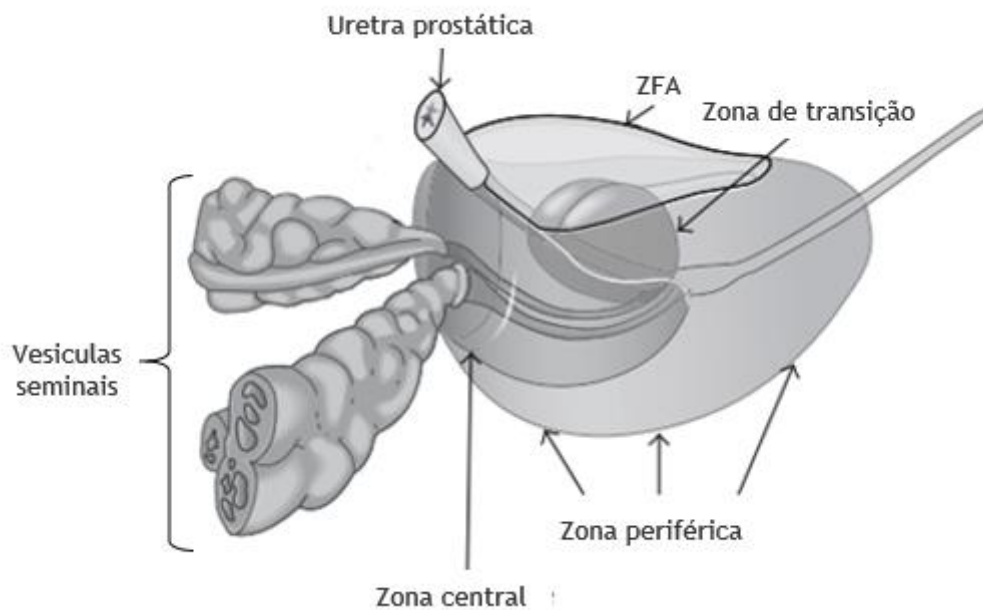


Figura 2 - Representação da próstata humana e as diferentes zonas que a constituem. ZFA - Zona fibromuscular anterior (Bhavsar & Verma 2014).

1.1.2. Carcinogénese/patofisiologia

Cancro da próstata é o segundo cancro maligno mais diagnosticado na população masculina e a quinta maior causa de morte oncológica entre os homens (Dunn & Kazer 2011; Attard et al. 2016). As taxas de incidência variam amplamente entre as regiões do mundo, com quase 70% dos casos ocorrendo em áreas mais desenvolvidas. Em termos de mortalidade, as taxas têm diminuído na maioria dos países desenvolvidos, embora aumentos constantes ainda sejam observados em muitas regiões, podendo refletir diferenças no acesso ao diagnóstico precoce e no tratamento do cancro da próstata (Center et al. 2012).

Em Portugal, de acordo com os dados mais recentes publicados, o cancro da próstata foi o cancro mais frequente entre os homens em 2010, com 6080 casos diagnosticados, representando 23,7% dos casos globais de cancro, e uma taxa de incidência bruta de 120,3 / 100 000 (RORENO 2010).

Homens com cancro da próstata podem apresentar baixa qualidade de vida, causada tanto pela própria doença como pelas consequências do tratamento (Daniyal et al. 2014). Os fatores de risco como a idade avançada, raça e a genética são os que têm sido mais associados à incidência do cancro da próstata e à sua agressividade (Gann 2002).

A idade avançada é um dos grandes fatores de risco para o cancro de próstata. O cancro de próstata raramente é diagnosticado em homens com idade inferior a 40 anos de idade, e a mortalidade é relativamente rara antes dos 50 anos de idade. As taxas de incidência do cancro da próstata aumentam exponencialmente a partir dos 55 anos, uma tendência observada em múltiplas populações (Gann 2002; Wilson et al. 2012). A incidência de cancro da próstata e as taxas de mortalidade diferem na raça / etnia. Nos Estados Unidos, a incidência é maior entre os afro-americanos, porém a etnia caucasiana também tem incidência alta. Homens asiáticos são os que possuem taxas de incidência e mortalidade mais baixas do mundo. Homens com história familiar de cancro da próstata possuem maior risco de diagnóstico de cancro da próstata e mortalidade. Homens cujo pai foi diagnosticado com cancro de próstata têm aproximadamente o dobro do risco que homens sem histórico familiar paterno. Ter um irmão afetado, também aumenta o risco (Gann 2002; Wilson et al. 2012).

Dieta, estilo de vida e o ambiente também tem sido apontados como fatores de risco para o cancro da próstata, havendo uma maior incidência desta patologia em países desenvolvidos do que em países em desenvolvimento (Theophilou et al. 2015; Wilson et al. 2012).

Relativamente ao processo de carcinogénese e metastização do cancro da próstata, estes estão associados a mutações e danos genéticos, tanto a nível nuclear como a nível mitocondrial. Essas alterações conduzem a alterações nas vias de sinalização, culminando com um aumento descontrolado da proliferação, maior resistência à apoptose, e maior capacidade de invadir os tecidos adjacentes (Udendi & Tchounwou 2016). Assim como outros carcinomas, sabe-se que o cancro da próstata é um cancro hormono-dependente que depende dos efeitos tróficos dos estrogénios e androgénios que contribui para o desenvolvimento e/ou progressão do cancro da próstata (Debes & Tindall 2002; Feldman & Feldman 2001).

Ao nível celular, a inflamação crónica é responsável pelo desenvolvimento de diversos tipos de cancro, incluído o cancro da próstata, que estima-se que um quinto dos casos de cancro da próstata é o resultado de inflamação crónica (Omabe & Ezeani 2011). Esta pode ter uma grande contribuição na carcinogénese por infligir danos celulares e genómicos, conduzindo à libertação de uma grande quantidade de citocinas que induzem a replicação celular, angiogénese e reparação do tecido (De Marzo et al. 2004).

Na próstata, a inflamação crónica pode ter numerosas causas como infeções, dieta, mudanças hormonais ou até mesmo a exposição a fatores tóxicos presente no meio ambiente. Inicialmente há uma inflamação local, levando a danos no tecido epitelial prostático. Ocorre uma resposta do tecido a estes danos, designada por atrofia proliferativa inflamatória (PIA), onde há uma hiper-proliferação regenerativa do epitélio (De Marzo et al. 2013).

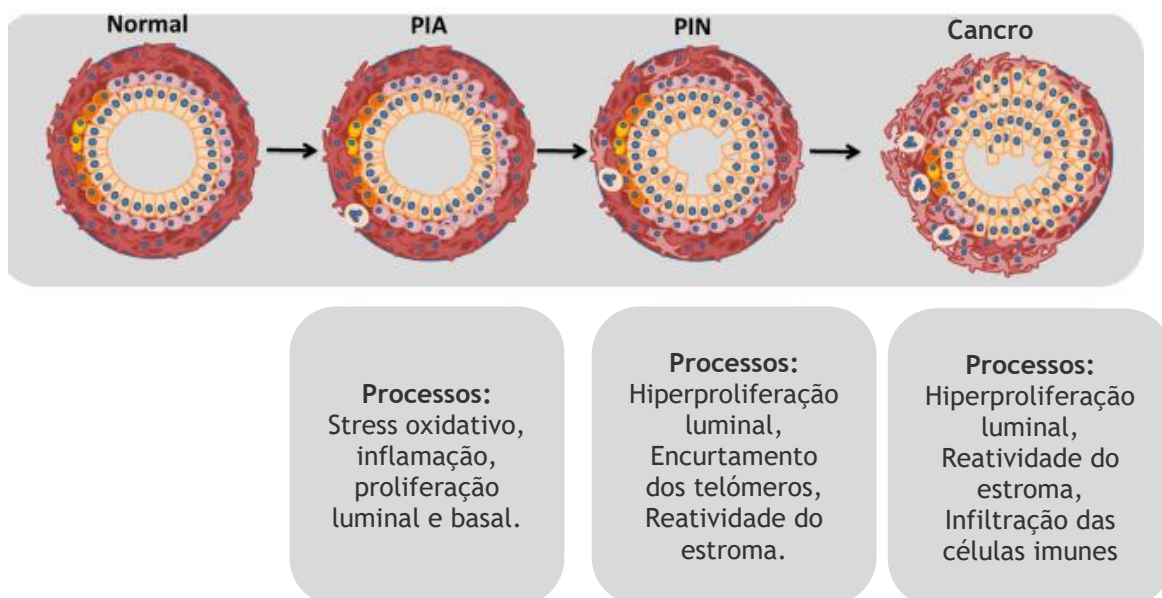


Figura 3 - Processos de transformação e de fenótipos dos estados pré-malignos do cancro da próstata (Adaptação de Packer & Maitland 2016).

O termo de PIA foi usado pela primeira vez por De Marzo et al. (1999) para descrever lesões prostáticas com o aumento de células inflamatórias. Concluíram que a PIA era o precursor da neoplasia intraepitelial prostática (PIN). Esta condição é caracterizada por mudanças na morfologia das células da prostáticas, mas não se desenvolvem para outras partes da próstata (como as células cancerígenas). Baseado na aparência dos padrões de células, podem se classificar como: PIN de baixo grau (padrões de células da próstata que parecem quase normais) ou PIN de alto grau (padrões de células que são parecidas a células aberrantes). O PIN de alto grau é considerado pré-cancro de próstata, porque ao longo do tempo pode vir a tornar-se em cancro da próstata. As células epiteliais atroficas em proliferação da PIA parecem estar a regenerar em resposta a danos celulares, mostrando sinais de stress oxidativo e, podendo vir a tornar células anormais originando PIN e/ou cancro da próstata. Desde então, muitos estudos realizados têm demonstrado essa relação entre PIA, PIN e cancro da próstata (De Marzo et al. 2004; Sfanos & de Marzo 2012; Sfanos et al. 2014).

Atualmente, existem outras hipóteses para a origem do cancro que vão em conta à evidência da heterogeneidade do cancro (Packer & Maitland 2016).

Um dos modelos, definido como evolução clonal, defende que, como o nome indica, existe uma produção de células (clones), através de mitoses sucessivas, com potencial da propagação de tumor, partindo de uma única célula aberrante que sofreu mutações em oncogenes e/ou em genes supressores de tumor. A heterogeneidade é então gerada pelas mutações contínuas na descendência da célula iniciadora. Cancros primários da próstata geralmente abrangem múltiplos focos de tumor morfologicamente e clonalmente distintos devido ao acumulo sequencial de várias lesões genéticas (Haffner et al. 2013).

Outro modelo é designado como modelo de células estaminais cancerosas. Esta hipótese afirma que o cancro pode ter como base uma linhagem de células estaminais anómalas, nas quais é

acumulado as mutações genéticas e/ou lesões celulares, resultando, após várias mitoses e diferenciações celulares, em células totalmente diferentes das células normais da próstata. As células que seguem este modelo conseguem manter a heterogeneidade, conservando os clones aberrantes ao longo do tempo e progredir para o cancro. Este modelo pode explicar a apresentação tardia e a lenta progressão do cancro da próstata, uma vez que as células estaminais adultas são as únicas células que, em condições normais, não são esgotadas por diferenciação, desenvolvimento ou morte celular (Collins et al. 2005).

Para confirmar se o paciente tem cancro da próstata, terá de ser submetido a exames para confirmar a existência deste. Neste momento, existe uma glicoproteína com atividade de serina-protease, secretada pelas células epiteliais da próstata, denominada por antigénio específico da próstata (PSA), que é um marcador crucial de cancro da próstata, tendo reduzido a taxa de mortalidade pela doença (Taverna et al. 2015). A quantificação dos níveis séricos de PSA tem sido um grande avanço a nível clínico, no entanto, apresenta uma baixa especificidade, ou seja, esta glicoproteína pode estar elevada em condições não neoplásicas, como por exemplo na hiperplasia benigna da próstata (HBP), prostatite ou infarto da próstata (Ziaran et al. 2015). Existe outro método de deteção de cancro da próstata, recorrendo a uma biópsia da próstata guiada por ultra-sonografia transretal. Tem sido o procedimento na deteção de cancro da próstata mais usado, mas a eficiência deste ainda é debatida e é limitada na prática devido à tolerância e morbidade do paciente (Danyal et al. 2014; Taverna et al. 2015).

Após a realização da biópsia, o patologista examina a amostra dando uma pontuação tendo em conta a morfologia do tecido, designada como *Gleason Score*. Esta pontuação é bastante importante para determinar a agressividade do cancro da próstata. O *Gleason Score* varia entre 1 e 5, refletindo o quanto o cancro da próstata da biópsia se assemelha com tecido saudável ou com um tecido anormal. Como os tumores de próstata são geralmente compostos por células cancerosas de diferentes graus, são atribuídos os dois *scores* mais frequentes na amostra tumoral. Por exemplo, se o índice de *Gleason* for escrito como $5 + 3 = 8$, significa que a maior parte do tumor é de grau 5 e a segunda maior seção do tumor é de grau 3, e juntos formam o total de *Gleason*. Se cancro da próstata tiver a mesma constituição para os dois *scores*, o grau para essa área é contado duas vezes para calcular o *score* total. Assim o *Gleason score* total pode ir de 2 a 10. *Scores* abaixo de 6, as células tumorais apresentam uma grande semelhança às células normais, sugerindo que o cancro da próstata está a crescer lentamente; *Score* 7, estado intermediário de cancro da próstata e *score* igual ou maior a 8, cancro da próstata está numa fase bastante avançada e agressiva (Chen & Zhou 2016; Gleason 1977).

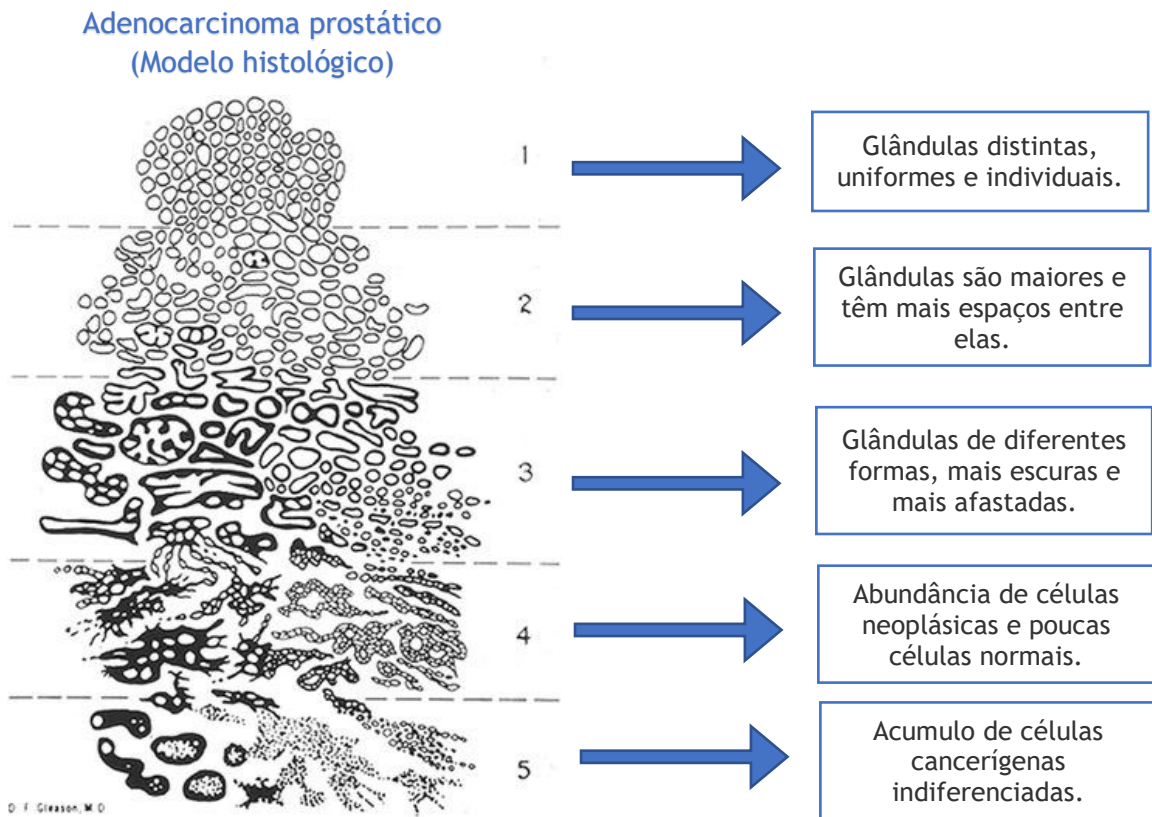


Figura 4 - O diagrama original do sistema Gleason Score (Adaptação de Gleason 1977).

O cancro da próstata localizado pode ser tratado por remoção cirúrgica da próstata ou por radioterapia local, mas existe situações de pacientes tratados que apresentam recorrências (Attard et al. 2016) . Está comprovado que o crescimento do cancro da próstata é dependente de androgénios (Feldman & Feldman 2001) .

O cancro de próstata depende da proporção entre as células em proliferação e as que estão em morte celular. Os androgénios são os principais reguladores dessa relação, devido a estimular a proliferação e inibir a apoptose. Assim, o cancro de próstata depende de um nível crucial de estimulação androgénica para o crescimento e a sobrevivência. Androgénios são hormonas esteroides masculinas, que estimulam ou controlam o desenvolvimento e manutenção das características masculinas dependendo da ligação de recetores androgénios (RA). Estas hormonas são importantes para morfogénese, diferenciação, proliferação celular e secreções da glândula prostática, e também tem sido usado como alvo para o tratamento endócrino de cancro da próstata e HPB (Feldman & Feldman 2001). Na figura 5 está representado esquematicamente a ação dos androgénios.

Após a ligação do androgénio ao recetor, estes ligam-se nas regiões reguladoras dos genes alvo, onde irá formar um complexo com co-ativadores ou co-repressores, promovendo uma modificação local da estrutura da cromatina, e conseqüentemente, regulam a expressão génica (Udensi & Tchounwou 2016). Esta sinalização tem sido focada no cancro da próstata desde a descoberta da castração, supressão de hormonas esteroides, em homens com cancro da

próstata avançada, que resultou numa regressão da doença. Terapia endócrina de cancro da próstata, tem como função a inibição da função de RA, diminuindo os níveis de androgénio.

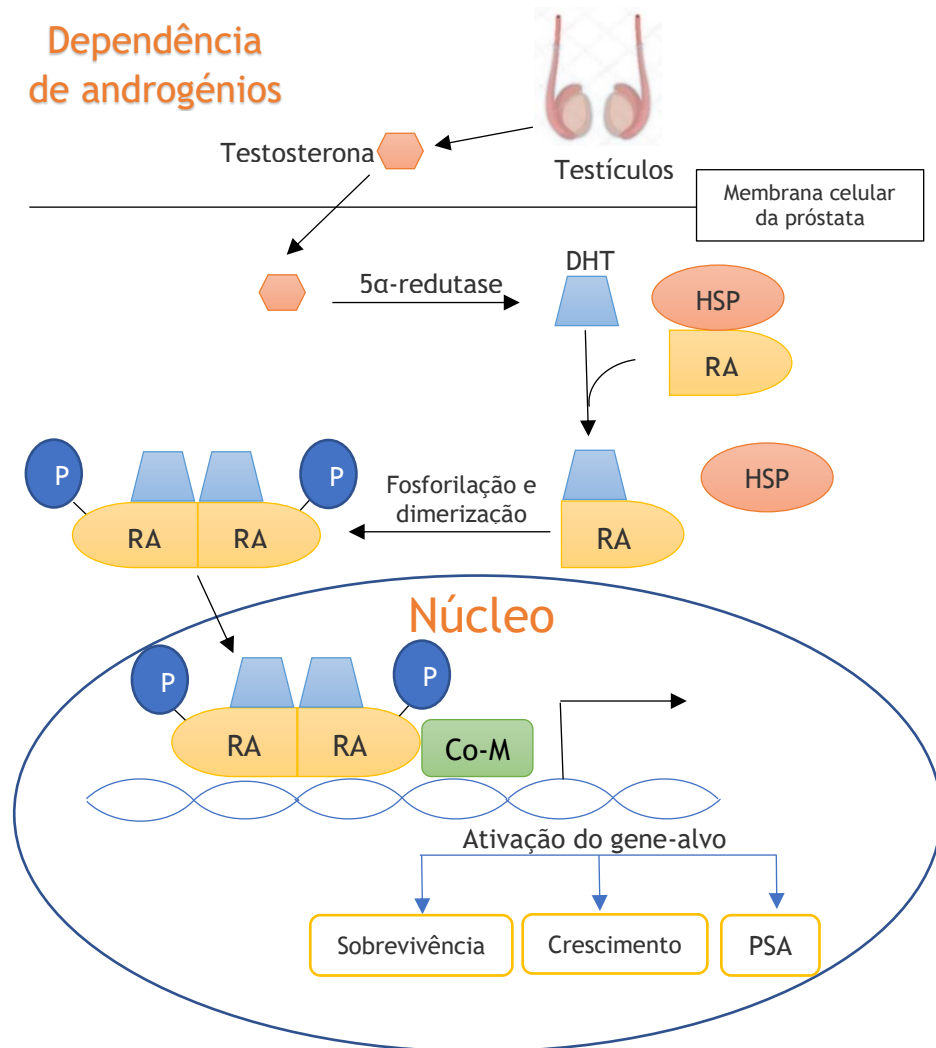


Figura 5 - Esquema ilustrativo da ação dos androgénios na próstata. A testosterona, o principal androgénio circulante, é secretada principalmente pelos testículos. Circula no sangue, onde se liga à albumina e globulina de ligação a hormonas sexuais (SHBG), com uma pequena fração dissolvida livremente no soro. A testosterona entra nas células da próstata e é convertida em di-hidrotestosterona (DHT) pela enzima 5α-redutase. A ligação de DHT ao RA induz a dissociação de heat shock protein (HSPs) e fosforilação do recetor. O RA dimeriza e liga-se a elementos de resposta ao androgênio nas regiões promotoras dos genes-alvo. Co-moduladores também ligam ao complexo RA. A ativação (ou repressão) de genes alvo conduz respostas biológicas incluindo crescimento, sobrevivência e produção de antigénio específico da próstata (PSA) (adaptada de Feldman & Feldman 2001).

A abolição de androgénios provoca regressão do cancro, uma vez que sem androgénios, a taxa da proliferação é baixa e a taxa de morte celular aumenta, levando à extinção das células. Embora muitos tumores da próstata mostrem uma resposta inicial à terapia endócrina, aproximadamente em um a três anos, todos os tumores ganham resistência à terapia, desenvolvendo uma doença descrita como o cancro da próstata resistente à castração (CPRC) ou cancro da próstata independente de androgénios (Feldman & Feldman 2001; Grasso et al. 2012). Na figura 6 está representados as causa de CPRC.

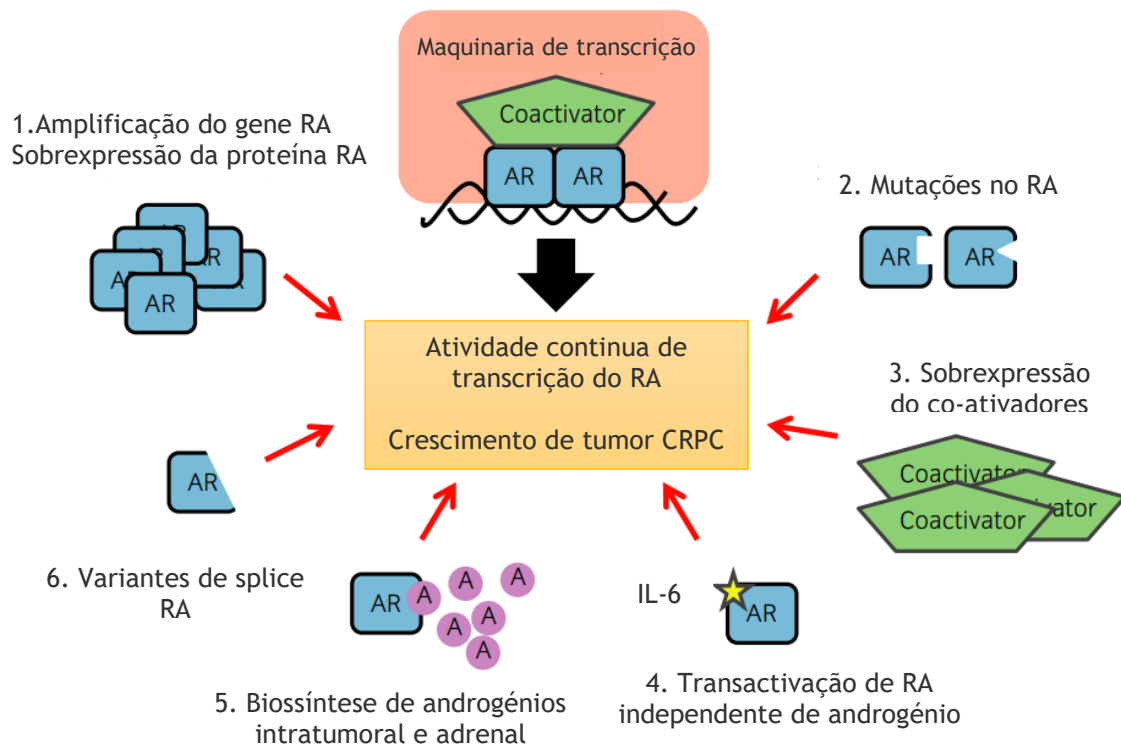


Figura 6 - Biologia Molecular do CPRC. A atividade de transcrição contínua de RA é um dos principais impulsionadores da maioria dos CPRC. Existem vários mecanismos moleculares propostos para explicar a atividade aberrante da RA. 1: Amplificação do gene RA e sobreexpressão da proteína RA, que proporcionam hipersensibilidade a baixos níveis de androgênio. 2: Mutações na função de RA que permitem que o recetor seja ativado por ligantes não androgénicos, como os glicocorticóides. 3: Sobreexpressão de co-ativadores de RA que podem aumentar a dependência de androgénios e também promover atividades de transcrição RA dependentes de ligandos. 4: Transativação de AR independente de androgénios, tal como a citocina IL-6, que pode estimular a atividade de transcrição AR na ausência de androgénio. 5: Aumento da biossíntese de androgénio adrenal e / ou intratumoral, gerando um nível baixo, mas suficiente, de androgénio para suportar a atividade transcritora da AR. 6: Variantes de splice AR, que têm o potencial de ser constitutivamente ativo, independentemente da presença de andrógeno (Adaptação de Imamura & Sadar 2016).

1.1.3. Alterações genéticas

Dados sobre a base molecular do cancro da próstata têm tido uma rápida expansão durante estes últimos anos, com uma notável heterogeneidade genética, podendo ser a prova do comportamento clinicamente variável da doença. (Grasso et al. 2012).

Alterações na expressão dos genes HOX foram detetadas em células do cancro da próstata humano. Os genes HOX são responsáveis pelo desenvolvimento dos lobos separados da próstata, das vesículas seminais e do epidídimo (Javed & Langley 2014). Miller *et al.* (2003) mostrou que existe uma sobreexpressão dos genes HOXC4, HOXC5, HOXC6 e HOXC8 em linhas celulares malignas e em metástases no cancro da próstata. Os genes HOX também podem ter um papel na sinalização de RA, que tem um papel importante na regulação do crescimento e diferenciação de células prostáticas normais e cancerígenas (Javed & Langley 2014).

TRPV6 é um canal membranar que está relacionado com a absorção de cálcio no intestino. O TRPV6 é fortemente expresso em cancro da próstata avançado e correlaciona-se

significativamente com *Gleason score 7*, representando um forte marcador de progressão tumoral e subsequente invasão de tecidos subjacentes. O TRPV6 forma canais altamente seletivos de cálcio nas células da próstata, cuja corrente de amplitude e comportamento de inativação são rigidamente regulados pela concentração de cálcio intracelular. Além disso, já foi demonstrado que o canal TRPV6 está envolvido no controlo da proliferação de cancro da próstata e da resistência à apoptose (Lehen'kyi et al. 2011).

Espécies reativas de oxigénio são moléculas instáveis presentes na maioria dos sistemas biológicos. Ocorrem naturalmente em grande parte das células eucarióticas devido ao metabolismo energético dependente de oxigénio. A constante exposição dos tecidos leva ao organismo a desenvolver uma série de mecanismos de defesa antioxidante. Caso a produção destas moléculas aumente anormalmente, podem superar a defesa antioxidante celular e causar danos ao DNA e proteínas (Meiers et al. 2007). Esses danos podem levar a mutações e/ou alterações em oncogenes ou genes supressores de tumor. A isoenzima citosólica glutathione S-transferase pi (GSTP1) é uma enzima de defesa antioxidante que inativa compostos eletrofílicos com a glutathione. Existem várias classes desta enzima, que foram previamente encontradas no tecido prostático humano, sendo a GSTP1 a mais abundante (Di Ilio et al. 1990). A sequência reguladora próxima do gene GST é inativada por hipermetilação durante os estágios iniciais da carcinogénese prostática, originando na privação da expressão do gene (Lin et al. 2001). Com isto, a maioria dos cancros da próstata não consegue expressar GSTP1. É a primeira e mais comum alteração genética observada no cancro da próstata esporádico (Feldman & Feldman 2001).

Genes reguladores do ciclo celular, como oncogenes, e genes reguladores da apoptose como bcl-2, p53, também participam nos processos de proliferação e formação tumoral de diversos tecidos incluindo a próstata (Brum et al. 2001; Brum et al. 2003). O gene supressor de tumor p53, tem sido um dos genes mais mutados no cancro humano. Estudos recentes mostraram deleções e mutações pontuais no locus TP53 em cancro próstata. Análises mais aprofundadas dos dados do genoma inteiro sugerem que a desregulação da p53 ocorre precocemente no cronograma da doença (Barbieri & Tomlins 2015). Bcl2 é um gene antiapoptótico que está envolvido em múltiplos passos da carcinogénese da próstata, podendo participar na supressão da apoptose e/ou na estimulação da angiogénese tumoral (Fernandez et al. 2001).

A progressão no ciclo celular é regulada por múltiplos fatores, entre eles as hormonas, como os androgénios, e fatores de crescimento. As células neoplásicas, normalmente, apresentam anormalidades na resposta celular a fatores de crescimento e nos seus recetores, proteínas envolvidas nas vias de transdução do sinal hormonal e fatores de transcrição nucleares. Estas alterações levam a uma desregulação nas vias de sinalização oncogénicas que promovem a proliferação, inibem a apoptose e promovem a angiogénese (Agarwal 2000). Uma das hormonas associada a regulação génica é a vitamina D.

1.2. Vitamina D

Vitamina D, ou calciferol, é uma designação geral de um grupo de compostos lipossolúveis, responsáveis pela manutenção do equilíbrio mineral no corpo, em especial do metabolismo do cálcio. Este grupo é composto pela forma ativa da vitamina D (1 α ,25-dihidroxi-vitamina D ou calcitriol), isómeros (vitamina D₂ ou ergocalciferol e vitamina D₃ ou colecalciferol) e produtos de degradação, os quais podem manter alguma atividade metabólica. Todas estas moléculas provêm de um esteroide presente nas células da pele, 7-deidrocolesterol (7-DHC), através de sucessivas reações fotolíticas e enzimáticas (Christakos et al. 2016; Girgis et al. 2013; Pilz et al. 2018).

O seu metabolito ativo, calcitriol, é reconhecido como uma hormona esteroide integrante do sistema endocrinológico da vitamina D. Esse sistema é formado pelas moléculas anteriormente mencionadas, pela proteína transportadora (DBP, *vitamin D binding protein*), pelo recetor (VDR, *vitamin D receptor*) e pelas diversas enzimas que participam nas sucessivas reações de ativação e inativação da vitamina. Para além de ser integrante deste sistema, o calcitriol está envolvido em outros processos celulares, entre as quais a modulação da autoimunidade, síntese de interleucinas inflamatórias e no controlo da pressão arterial. Também participa na regulação de processos de proliferação e diferenciação celular (Christakos et al. 2016).

Atualmente, esta vitamina tem tido um grande interesse ao nível da investigação devido à grande carência da vitamina D na população (Wang & Tenniswood 2014). Para além disso, diversos estudos sugerem que o calcitriol possui propriedades benéficas para numerosas doenças como a inibição da progressão de células tumorais da mama, do cólon e da próstata (Girgis et al. 2013).

1.2.1. Síntese e Metabolismo da Vitamina D₃

Na figura 7 encontra-se esquematicamente a via de metabolização da vitamina D. Quando a pele é exposta à radiação ultravioleta, ocorre uma conversão fotoquímica de 7-DHC a pré-vitamina D₃. Esta pré-vitamina D₃, sendo termossensível, sofre de imediato uma isomerização, originando vitamina D₃. A síntese endógena de vitamina D₃ é a mais importante fonte para o ser humano e depende da intensidade da radiação UV, sendo influenciada pela latitude e estação do ano, bem como a exposição que é influenciada pelo uso de roupa, protetor solar, etnia e idade. A vitamina D para além de ser sintetizada pela pele, ela pode ter origem na dieta. Deriva de alimentos que ingerimos diariamente como peixe, cogumelos e ovos, representando 10-20% da vitamina necessária para um normal funcionamento do sistema endócrino. Esta tem duas isoformas quando provêm da alimentação; vitamina D₂, de origem vegetal, e vitamina D₃, encontradas em alimentos de origem animal (Christakos et al. 2016; Girgis et al. 2013; Pilz et al. 2018).

Ações da vitamina D na regulação da Regucalcina no cancro da próstata

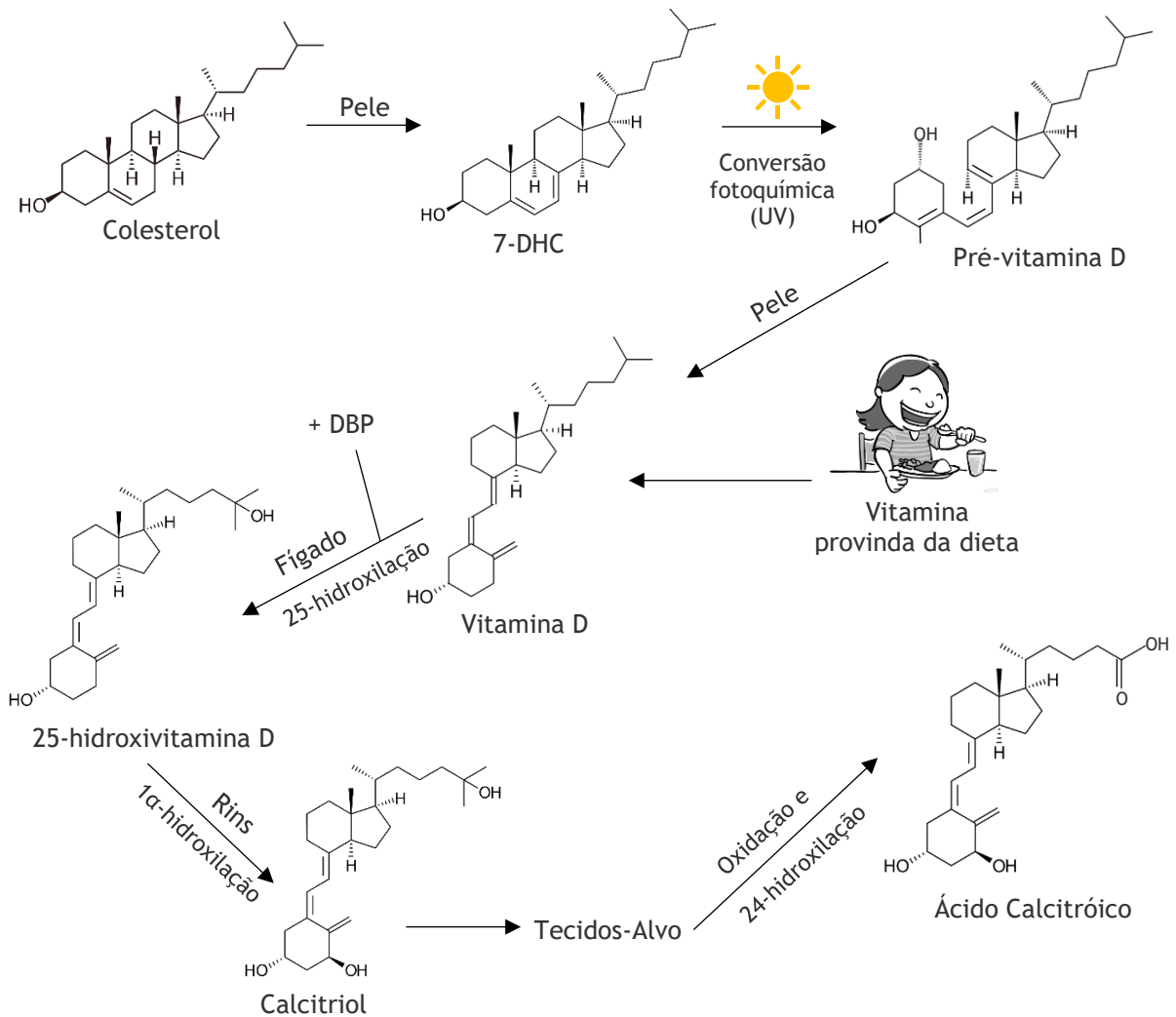


Figura 7 - Representação esquemática da via de metabolização da vitamina D (Adaptação de Christakos et al. 2016).

A vitamina D₃ por si mesma não é biologicamente ativa, tendo que ser transportada do sangue para o fígado, pela proteína DBP, que tem como função transportar todos os metabolitos da vitamina D do sangue até ao órgão/tecido alvo. No fígado, a vitamina D₃ sofre uma hidroxilação, pela 25-hidroxilase (CYP2R1), no C-25 para produzir 25-hidroxi-vitamina D₃. 25-hidroxi-vitamina D₃ é o metabolito que possui maior afinidade a DBP e também é a principal forma circulante, sendo o principal biomarcador dos níveis de vitamina D (Girgis et al. 2013).

Após esta modificação, 25-hidroxi-vitamina D₃ é transportada pela DBP para os rins, onde é filtrada no glomérulo. Nos rins, existe uma proteína transmembranar, membro da superfamília de recetores de lipoproteínas de baixa densidade, designada como megalina renal. DBP liga-se a este recetor na superfície das células epiteliais tubulares, provocando a captação, por internalização endocítica, do complexo, degradação da DBP e translocação da 25-hidroxi-vitamina D₃ para a mitocôndria. Na mitocôndria, ocorre uma hidroxilação da 25-hidroxi-vitamina D₃, catalisada por 1α-hidroxilase (CYP27B1 mitocondrial), na posição C-1 do anel A, resultando na formação de 1,25(OH)₂D₃, ou calcitriol, a forma ativa da vitamina D. A 1α-hidroxilase é a enzima mais regulada neste sistema endócrino. A hormona da paratiroide (PTH)

estimula a produção da 1α -hidroxilase e promove a síntese do calcitriol. Por outro lado, o fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF23) induz a expressão de 24-hidroxilase (enzima de inativação do calcitriol) mas também suprime a expressão e atividade da 1α -hidroxilase, diminuindo a síntese do calcitriol. Níveis de cálcio elevados no sangue inibe a secreção de PTH e consequentemente suprime a atividade de 1α -hidroxilase enquanto os níveis elevados de fosfato estimula a expressão de FGF23 (Zeljic et al. 2017; Girgis et al. 2013). Além destes fatores, o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regula negativamente sua própria síntese, suprimindo a expressão da 1α -hidroxilase nos rins. O último passo da metabolização da vitamina D, é a sua inativação. Ocorre uma conversão da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a $1,24,25-(\text{OH})_3\text{D}_3$ e ácido calcitróico e também uma conversão $25(\text{OH})\text{D}_3$ para $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ambas as conversões catalisadas pela 24-hidroxilase (CYP24A1). CYP24A1 converte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e $25(\text{OH})\text{D}_3$ em produtos 24-hidroxilados, que são moléculas com atividade biológica reduzida ou nula (Zeljic et al. 2017). Esta enzima é encontrada em quase todas as células e é altamente expressa pelo rim, sendo a sua função limitar a quantidade de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em tecidos-alvo (Girgis et al. 2013) .

1.2.2. Mecanismo de ação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$

As ações biológicas da vitamina D são mediadas pelo VDR, que é um recetor nuclear que pertence à família de recetores esteroides, incluindo os recetores para hormonas esteroides sexuais e ácido retinóico. A proteína contém três regiões distintas: um domínio N-terminal de *finger zinc* duplo no qual se liga ao DNA (uma característica da família de recetores de esteroides), um domínio C-terminal que se liga ao calcitriol e uma região extensa não estruturada que liga a estes dois domínios funcionais. O calcitriol atravessa a membrana plasmática da célula-alvo e liga-se ao VDR, que está presente na membrana nuclear. Quando ocorre esta interação ligando-recetor, há uma mudança de conformação que permite, ao entrar no núcleo, a dimerização com o recetor retinoide X (RXR). Este complexo irá funcionar como fator de transcrição, ou seja, irá interagir com elementos responsivos à vitamina D (VDRE), localizados na região promotora de numerosos genes alvos (Takeshita et al. 2000). Isto resulta no recrutamento de co-moduladores (co-ativadores ou co-repressores) que irão modular a regulação da transcrição dos genes alvos, isto é, a estimulação ou repressão da transcrição do gene. Este complexo $1,25\text{D}$ -VDR-RXR está envolvido na regulação de várias funções celulares como a reparação de DNA, diferenciação celular, apoptose, metabolismo e stress oxidativo (Hausler et al. 1998).

1.2.3. Vitamina D e Cancro da próstata

A vitamina D é reconhecida como tratamentos de várias patologias como doenças relacionadas com o défice de mineralização dos ossos. Para além disso, níveis baixos de vitamina D tem sido associados ao cancro, infeções e doenças cardiovasculares, sugerindo um papel importante desta vitamina na nossa saúde (Girgis et al. 2013).

Com isto, o interesse em estudar as propriedades anticancerígenas da vitamina D, em vários tipos de cancro, tem aumentando ao longo do tempo (Deeb et al. 2007; Feldman et al. 2014).

Indução da apoptose, e a inibição da proliferação, angiogénese, invasão e metástase, são os principais efeitos anticancerígenos do calcitriol (Deeb et al. 2007; Feldman et al. 2014). Vários estudos têm sugerido a vitamina D e análogos com potencial utilização no tratamento do cancro (Feldman et al. 2014). No entanto, conhecer todos os componentes da via molecular anticancerígena da vitamina D será de grande importância para a prevenção e tratamento do cancro. (Zeljic et al. 2017).

Tabela 1- Propriedades anticancerígenas da Vitamina D e respetivos genes alvo (Adaptação de Zeljic et al. 2017).

Ação da 1,25(OH) ₂ D ₃	Modulação da expressão dos genes pela 1,25(OH) ₂ D ₃
Inibição da Proliferação celular	Aumento da p21 e p27 Diminuição CDKs
Diferenciação	Indução de marcadores pro-diferenciação: apolipoproteína D, PSA, E-caderina
Apoptose	Aumento de BAX e BAK Diminuição da BCL-2
Angiogénese	Diminuição de VEGF, HIF1α e IL8
Invasão e metástases	Aumento da TIMP1 e E-caderina Diminuição de MMP2 e MMP9

Na Tabela 1 estão representados as ações anticancerígenas da vitamina D e a modulação de genes alvos associados a esses efeitos. Atualmente, vários estudos mostram que o calcitriol e análogos retardam o crescimento de células cancerígenas ao deter as células na fase G0/G1 do ciclo celular, induzindo sua diferenciação ou induzindo a morte celular apoptótica. Para além na paragem da proliferação descontrolada, calcitriol influencia a angiogénese, diminuindo a adesão e a migração celular das células tumorais. A maioria das células tumorais, para além de expressarem o VDR, expressam também o CYP27B1 e o CYP24A1, permitindo às células regular o metabolismo do calcitriol. Esta regulação pode contribuir para a progressão das células cancerígenas. (Zeljic et al. 2017).

A expressão e função do canal TRPV6, foi demonstrado estar implicado no crescimento do cancro da próstata e na resistência à apoptose. Sendo o VDR um ativador direto do promotor do gene do TRPV6, a expressão de TRPV6 é regulada positivamente pelo calcitriol. Uma atividade antiproliferativa do calcitriol previamente relatada no cancro da próstata pode ser comprometida pela alta regulação do TRPV6 (Lehen'kyi et al. 2011).

No cancro, a homeostase do cálcio encontra-se desregulada de tal forma que compromete as funções fisiológicas normais. Para além destes efeitos atrás mencionados, a vitamina D regula a homeostase do cálcio, através da regulação da transcrição de genes que codificam proteínas de ligação ao cálcio, canais de cálcio e PTH (Hausler et al. 1998).

1.2.4. Papel do cálcio no cancro da próstata

Para além da desregulação da expressão génica no cancro da próstata, a propagação de um sinal intracelular mediado pelo cálcio (Ca^{2+}) tem tido um interesse particular para entender a doença. Este ião controla diversos processos celulares, como por exemplo a proliferação, morte, motilidade celular. A ação do Ca^{2+} depende das alterações da concentração a nível celular, ou seja, quando a concentração intracelular de Ca^{2+} atinge os 100 nM, as células encontram-se em repouso (ausência de sinal), mas quando estas são ativadas por recetores mobilizadores de Ca^{2+} , há entrada de Ca^{2+} para o citosol, aumentando a concentração, aproximadamente, até cerca de 1000 nM (Berridge et al. 2000).

As células geram sinais próprios de Ca^{2+} usando fontes internas e externas. Esta rede de sinalização do Ca^{2+} pode ser dividida em quatro etapas (Figura 8): a primeira etapa envolve uma sinalização, desencadeada por um estímulo, que gera vários sinais de mobilização de Ca^{2+} . Na etapa seguinte há uma ativação de mecanismos que aumentam os níveis citosólicos de Ca^{2+} e pode ocorrer por dois mecanismos (representados a verde na Figura 8): i) envolve uma ativação da enzima fosfolipase C (PLC), que está associada à ativação de recetores acoplados a proteínas G. Esta enzima cliva proteínas ligadas à membrana plasmática, denominadas de 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP_2), originando 1,4,5 trisfosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol. Este IP_3 liga ao seu recetor, um canal de cálcio localizado no retículo endoplasmático, causando a libertação de cálcio para o citosol; ii) influxo de cálcio extracelular através da membrana plasmática. Esse influxo ocorre através de canais de cálcio da membrana, permitindo ao ião entrar na célula de acordo com o seu gradiente de concentração. Este mecanismo decorre quando há um esgotamento de Ca^{2+} nos reservatórios. Terceira etapa, o Ca^{2+} vai estimular inúmeros processos sensíveis a este, estando representados na figura 8. Finalmente, como última etapa (representado a laranja), há remoção de Ca^{2+} do citoplasma para restauração do estado de repouso da célula. Esta etapa pode ser conseguida através de armazenamento de Ca^{2+} no RE através dos recetores *Store Operated Channels* (SOCs) e através de bombas de Ca^{2+} (Berridge et al. 2000; Maly & Hofmann 2018).

O controlo de cálcio intracelular é frequentemente mediada por várias proteínas de ligação ao cálcio, podendo ser proteínas sequestradoras, por exemplo a calsequestrina, que sequestram iões de cálcio sem gasto de energia, reduzindo a concentração de Ca^{2+} inicial, ou podem ser proteínas sinalizadoras, permitindo a amplificação ou a condução do sinal como a calmodulina, enzimas de sinalização sensíveis a cálcio tais como proteína cinase C (PKC), fosfolipase A_2 e alguns fatores de transcrição (Berridge et al. 2000; Wasilenko et al. 1997).

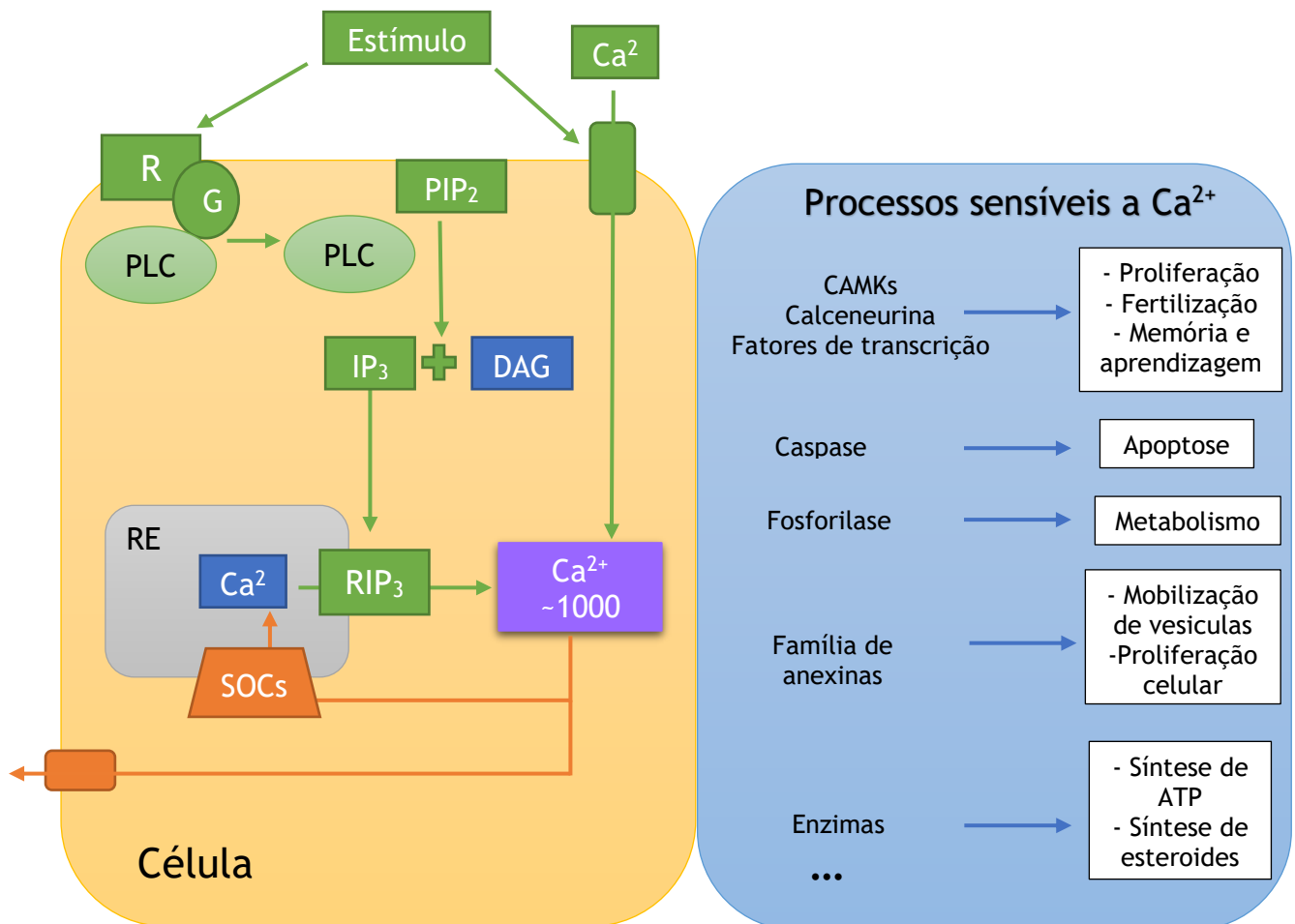


Figura 8 - Rede de sinalização de Ca^{2+} a nível celular. Legenda: recetor acoplado a proteína G (R e G), 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP₂), enzimas fosfolipase C (PLC), inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃), diacilglicerol (DAG), recetor de IP₃ (RIP₃) e *Store Operated Channels* (SOCs) (Adaptação de Berridge et al. 2000).

Diversos estudos têm demonstrado que o cálcio tem um papel importante na tumorigénese. A sinalização do Ca^{2+} em algumas células tumorais é claramente remodelada de tal forma que compromete as funções fisiológicas normais, fornecendo vantagens como resistência à apoptose, multiplicação descontrolada e dispersão para além do local do tumor primário. Esta remodelação da sinalização do cálcio é uma consequência das mudanças dinâmicas do genoma, da influência de fatores epigenéticos, ambientais ou respostas adaptativas que provocam o cancro (Berridge et al. 2000; Maly & Hofmann 2018; Prevarskaya et al. 2014). Wasilenko *et al.* (1997) mostraram que a sinalização celular aberrante é uma parte importante do processo de transformação de cancro da próstata. Foi demonstrado que o cálcio pode ser um componente

importante na resposta de sinalização dos carcinomas de próstata a diversos estímulos extracelulares. Foi ainda sugerido pelo mesmo autor que as células tumorais da próstata podem ser modelos apropriados para estudar a(s) influência(s) que os componentes sensíveis ao cálcio, têm na expressão do fenótipo maligno.

A PLC tem sido ligada à tumorigénese devido a sua sobreexpressão favorecer a transformação de células normais em células aberrantes. Outra enzima que é sobreexpressa em células cancerígenas é a fosfatidilinositol-4-OH cinase que cataliza a produção de PIP₂. Recentemente, estudo demonstra a importância de antagonistas da via do fosfatidilinositol ou do influxo de cálcio por conseguir impedir o crescimento de uma variedade de células tumorais cultivadas *in vitro* ou como xenoinxertos tumorais *in vivo* (Powis & Phil 1994).

Mais recentemente, os canais de Ca²⁺ e a quantidade de Ca²⁺ armazenado no RE também foram relacionados com o desenvolvimento do cancro da próstata. A proliferação das linhas celulares de cancro da próstata LnCaP e PC3 foi inibida por TH-1177, uma substância que bloqueia a entrada de Ca²⁺. Alterações no armazenamento de Ca²⁺ e no Ca²⁺ citosólico não foram descritas apenas para aumentar a proliferação e a expressão de Ca²⁺-ATPase sarcoendoplasmática (SERCA) em células LnCaP, mas também para induzir a apoptose. A sobreexpressão de Bcl-2 em células epiteliais de cancro da próstata resulta na regulação negativa da corrente de Ca²⁺, devido à diminuição da quantidade de canais funcionais e inibição da captação de Ca²⁺, através de uma redução na expressão de calreticulina e SERCA. A causa anterior por si só não é suficiente para induzir apoptose, é necessário também a entrada sustentada de Ca²⁺ através de SOCs, sugerindo um papel central dos SOCs na apoptose e na progressão do cancro. Assim, a homeostase do Ca²⁺ está criticamente envolvida no desenvolvimento e progressão do cancro da próstata. A identificação das principais moléculas de transporte de Ca²⁺ que alteraram a expressão e/ou a função subjacente às alterações patológicas fornece alvos promissores para o tratamento do cancro (Lehen'kyi et al. 2011).

1.3. Regucalcina

A regucalcina (RGN) também designada como *Senescence Marker Protein-30*, é uma proteína de ligação ao Ca²⁺ que tem um papel importante na manutenção da homeostase de Ca²⁺ celular, aumentando a atividade das bombas de Ca²⁺, presentes no RE e em outros organelos e captação de Ca²⁺ na mitocôndria (Yamaguchi 2005).

1.3.1. Propriedades, expressão e regulação da Regucalcina

O gene da RGN está localizado nos segmentos do cromossoma Xp11.3-Xq11.2, possui sete exões que codificam a proteína com 299 aminoácidos e com um peso molecular aproximadamente de 33 kDa (Yamaguchi 2005). A transcrição deste gene é regulada por vários fatores de transcrição como por exemplo o AP1, NF1-A1, RGPR-p117 e β -catenina (Misawa & Yamaguchi 2001; Murata & Yamaguchi 1998; Nejak-Bowen et al. 2009). Os níveis de Ca^{2+} , envolvendo a calmodulina ou a PKC, e hormonas sexuais, como 17 β -estradiol e DHT também tem sido descritos como reguladores da expressão da RGN (Laurentino et al. 2012; Maia et al. 2008). Diversos estudos têm associado alterações na expressão da RGN em várias situações patológicas (Cucuzza et al. 2015; Maia et al. 2009; Yamaguchi et al. 2016; Yamaguchi et al. 2017), indicando que a RGN tem uma grande importância na biologia celular.

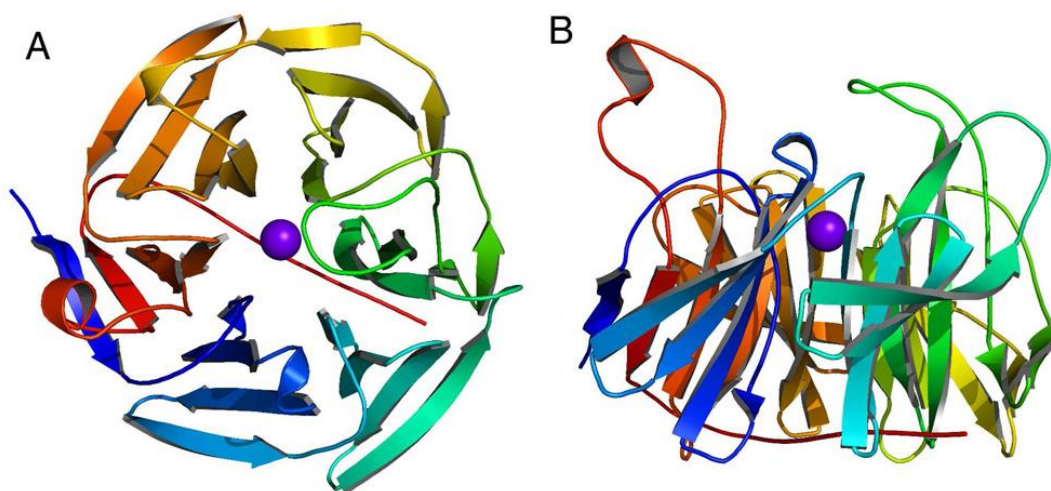


Figura 9 - Estrutura cristalina da regucalcina com ligação ao cálcio. Esfera roxa representa uma molécula de cálcio (Chakraborti & Bahnson 2010).

Esta é a primeira proteína de ligação a Ca^{2+} identificada que não contém o domínio *E-F hand motif* de ligação a Ca^{2+} (Yamaguchi et al. 1998). A estrutura geral da RGN contém 24 cadeias β que formam 6 folhas β , capazes de ligar a diversos cátions divalentes, como o Ca^{2+} e Zn^{2+} . Estrutura da RGN com ligação de uma molécula de cálcio está representada na figura 9. A RGN pode ser encontrada no osso, pulmão, mama, coração, próstata e outros tecidos de várias espécies de vertebrados e invertebrados, sendo altamente expressa no fígado e no córtex renal. A RGN foi localizada no núcleo celular, no citoplasma e na mitocôndria, sendo atribuída várias funções da proteína (Yamaguchi 2005).

1.3.2. Funções da Regucalcina

A RGN têm um papel multifuncional ao nível celular. Esta proteína possui propriedades antioxidantes, modulando a atividade de enzimas envolvidas no stress oxidativo, bem como na defesa antioxidante (Handa et al. 2009). Para além desta propriedade, a RGN consegue suprimir a proliferação celular através da diminuição da expressão de várias enzimas dependentes de Ca^{2+} de diversas vias de sinalização, como a síntese de óxido nítrico, fosfodiesterases, proteínas cinases e proteínas fosfatases e também ao translocar-se para núcleo, consegue inibir a síntese de DNA e RNA (Yamaguchi 2005).

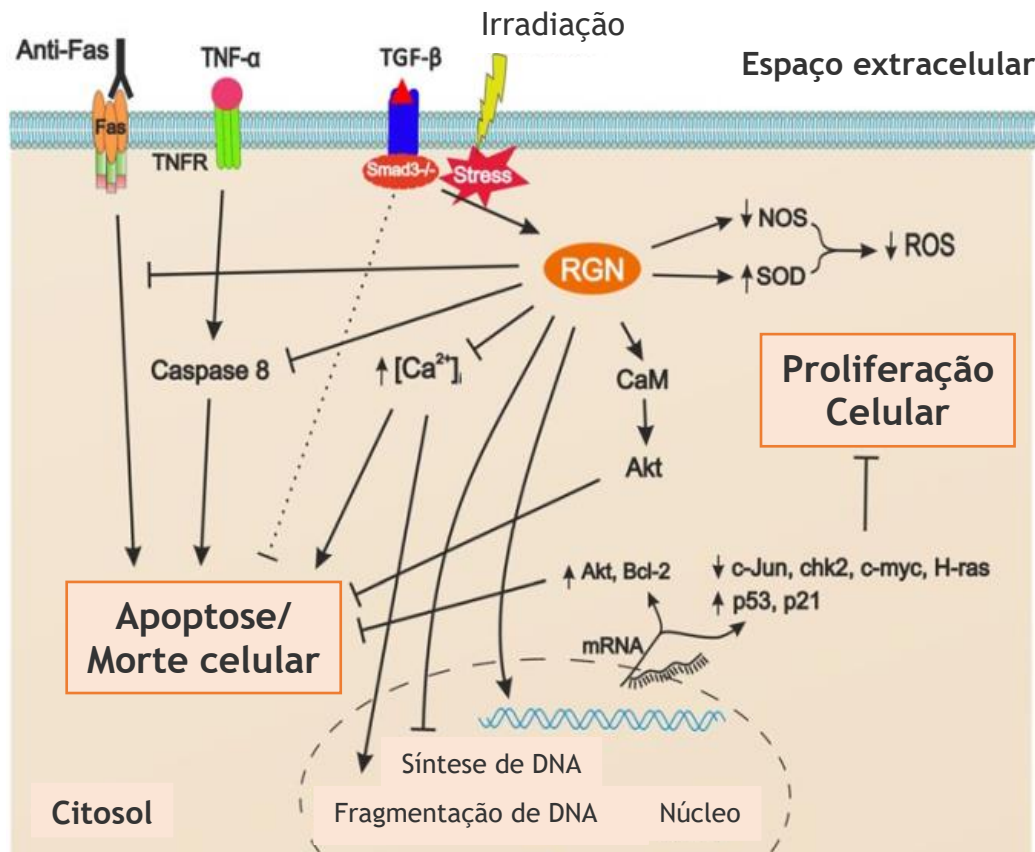


Figura 10- Representação esquemática dos mecanismos envolvidos no papel da regucalcina (RGN) controlando a proliferação celular e a apoptose. A regucalcina bloqueia a apoptose induzida pelo sistema Fas, inibe a apoptose através da diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio, bloqueio do aumento do cálcio intracelular, inibição da atividade da caspase 8, aumento da atividade da via de Akt e aumento da expressão dos inibidores de apoptose Akt-1 e Bcl-2. Por sua vez, o RGN aumenta a expressão das proteínas p53 e p21 enquanto decresce a expressão dos genes c-Jun, chk2, c-myc e H-ras, bloqueando assim a proliferação celular. Fator de necrose tumoral e seu recetor (TNF- α e TNFR), fator de crescimento tumoral (TGF- β), óxido nítrico sintase (NOS), superóxido dismutase (SOD), espécies reativas de oxigênio (ROS), calmodulina (CaM) (Adaptação de Marques et al. 2014).

Outra função bastante importante da RGN, é ter a capacidade de diminuir a concentração de Ca^{2+} intracelular, através da regulação da atividade de bombas de Ca^{2+} na membrana celular, núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndrias de vários tipos de células e conseguir suprimir a sinalização de Ca^{2+} do citoplasma para o núcleo de células em proliferação (Yamaguchi 2005). A RGN tem sido associada então à supressão da proliferação celular e indução da apoptose. Esta

proteína consegue regular a síntese e a fragmentação do DNA e modular a expressão de oncogenes, genes supressores de tumor e reguladores do ciclo celular (Nakagawa et al. 2005; Izumi & Yamaguchi 2004). Assim sendo, a regucalcina desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase celular e funciona como a proteína reguladora de várias vias de sinalização intracelular (Marques et al. 2014).

1.3.3. Regucalcina e o Cancro da próstata

O desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular está na base da carcinogénese, e a conversão em células aberrantes tem sido associada a alterações da sinalização do Ca^{2+} . A carcinogénese da próstata é fortemente dependente da estimulação estrogénica e androgénica e a homeostasia e sinalização de Ca^{2+} alteradas são associadas ao desenvolvimento do cancro da próstata, como descrito anteriormente.

Trabalhos prévios do nosso grupo de investigação demonstraram que a regucalcina, no cancro da próstata, tem a sua expressão diminuída, em comparação a casos de próstata não neoplásica ou em HBP. Linhas celulares neoplásicas da próstata (LnCap e PC3) têm níveis baixos de regucalcina em relação à linha celular não-neoplásica (PNT1A). Estes baixos níveis de RGN podem estar envolvidos no desenvolvimento e progressão de tumores da próstata, uma vez que estes níveis podem não ser suficientes para levar as células cancerígenas a morte celular nem a inibição da proliferação descontrolada (Maia et al. 2009; Vaz et al. 2014).

Capítulo II

2. Objetivos

O cancro da próstata é caracterizado pela desregulação da homeostase de cálcio. Uma das principais ações da vitamina D é regular genes que modulam a homeostase do cálcio em cancro da próstata. Uma vez que está mais que comprovado que a vitamina D têm ações anticancerígenas no cancro da próstata, o nosso trabalho tem como objetivo determinar o efeito desta vitamina na modulação da expressão da regucalcina no cancro da próstata. Com isto, avaliar os efeitos da vitamina D na modulação da expressão da regucalcina nas linhas celulares de cancro da próstata humano, torna-se um dos objetivos centrais deste estudo. Para atingir este objetivo, iremos usar PCR em tempo real (qPCR). Inicialmente ir-se-á cultivar linhas celulares de cancro da próstata e estimulação com a vitamina D, e posteriormente, extração de RNA total. A expressão da regucalcina em resposta ao estímulo com a vitamina D irá ser determinado por qPCR.

Capítulo III

3. Materiais e métodos

3.1. Cultura de Células e tratamento

Neste trabalho usou-se três linhas celulares: LnCap, PC-3 e PNT1A que foram obtidas de *European Collection of Cell Cultures* (ECACC, Salisbury, UK). As células destas três linhas celulares foram cultivadas separadamente em meio RPMI-1640 com *fenol red* (Gibco, Invitrogen, Paisley, Scotland) pH 7,3 suplementado com 1% antibiótico e 10% soro fetal bovino (FBS) (Biochrom AG, Berlin, Germany). As células foram incubadas a 37° e 5% CO₂ para crescerem de forma adequada e mimetizar as condições do organismo humano. Depois de atingirem uma confluência adequada, as células foram divididas em *T-flasks* T25 com meio RPMI sem *fenol red* e por sua vez divididas em quatro grupos dependendo do suplemento do meio: FBS e etanol 95% (FBS 0nM); FBS e vitamina D 10nM (FBS 10nM); Charcoal-stripped fetal bovine serum (Ch) (Gibco, Invitrogen) e etanol 95% (Ch 0nM) e por último Ch e vitamina 10nM (Ch 10nM). Para além destas condições do meio, as células foram estimuladas por 3h, 6h ou 12h. Posteriormente à paragem do estímulo, foram divididas para prosseguir paraa extração de RNA .

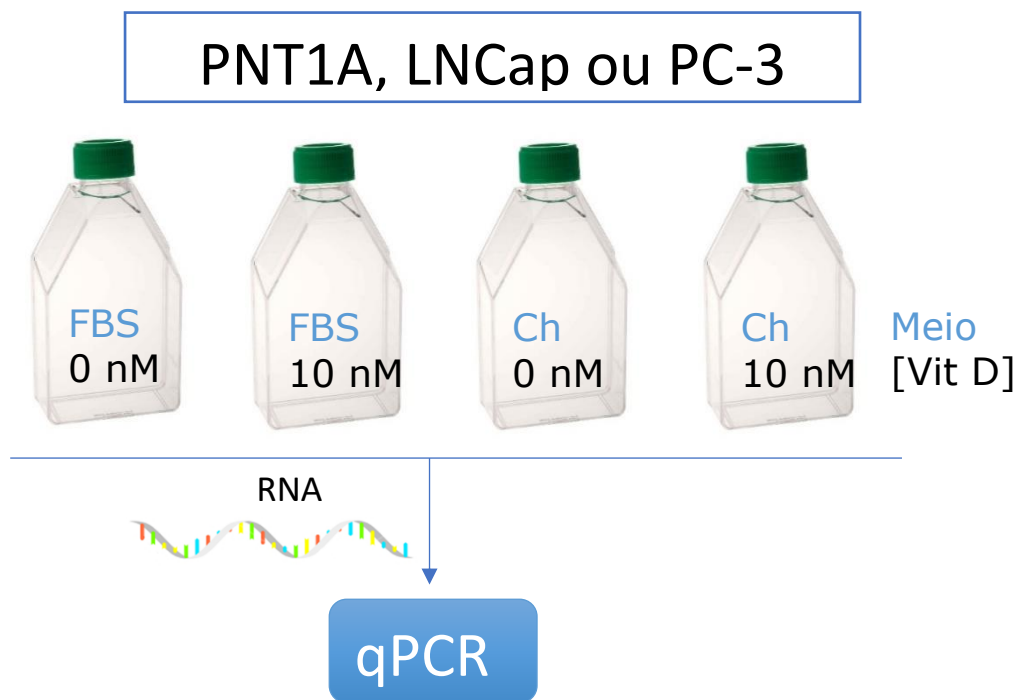


Figura 11- Representação esquemática do trabalho experimental desde da cultura de células até ao qPCR.

3.2. Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA é uma amostra bastante utilizada para diversos estudos. Sendo uma molécula instável, é necessária atenção e cuidado no seu manuseamento. Pode ser degradada por RNases, presentes em vários materiais biológicos, como por exemplo a nossa pele. A maioria dos protocolos segue os seguintes passos: lise das células; purificação das amostras (remoção de

contaminantes) e precipitação do RNA. Os reagentes utilizados na extração de RNA são: Trizol (Mantém o RNA intacto, enquanto degrada os outros componentes celulares) (Ambion, UK); Clorofórmio (promove a separação da solução em fase aquosa e orgânica, sendo que o RNA permanece na fase aquosa); Isopropanol (precipita o RNA presente na fase aquosa); Etanol 75% (remoção de sais que possam estar aderidos ao precipitado de RNA); Água DEPC (Dietilpirocarbonato) (livre de DNase e RNAase). RNA total, de cada linha celular, foi extraído com a ajuda do reagente TRI de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do RNA total extraído foi medida por espectrofotometria a 260 e 280 nm (Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000). Para verificar a integridade do RNA, ou seja, a sua qualidade, realizou-se uma eletroforese com um gel de agarose de 1%. Para a síntese de cDNA, foi usado o *Kit First Strand cDNA Synthesis*, usando 1µg de RNA de cada amostra.

3.3. PCR em tempo real

A metodologia de PCR em Tempo Real (qPCR) é uma versão rápida e melhorada do método de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase). O fundamento de qPCR consiste na duplicação de cadeias de DNA “*in vitro*” que é repetida diversas vezes, originando quantidade de DNA suficiente para realizar diversas análises. Esta técnica pode ser dividida em 3 etapas: Desnaturação, em que o DNA da amostra a ser amplificada é desnaturado, Hibridação ou *Annealing*, ligação de *primers Forward* e *Reverse*, da sequência de interesse, às cadeias de DNA correspondente de cada um; Polimerização ou extensão, a *Taq polimerase* liga-se à cadeia sinalizada pelo *primer*, complementando-a e formando assim novo fragmento de dupla cadeia de DNA. Este ciclo de três etapas é repetido inúmeras vezes até atingir milhões de cópias. O resultado é visualizado imediatamente, daí o nome PCR em tempo real, dispensando a eletroforese. Isto é possível pela adição de sondas fluorescentes às reações de PCR. A amplificação da amostra de DNA é monitorizada durante o processo de qPCR. Para obter resultados de expressão relativa ótimos, são necessárias estratégias de normalização apropriadas para controlar erros experimentais e garantir desempenho de ciclo idêntico durante a PCR em tempo real (iCycler iQ5™ system, Biorad). Para a normalização foi usado genes *housekeeping*. qPCR serviu então, para determinar a expressão da regucalcina nas linhas celulares do cancro da próstata humano. Normalização da expressão da regucalcina foi feita por dois genes *housekeeping*: human GAPDH (hGAPDH) (*sense*: CGCCAGCCGAGCCACATC; *antisense*: CGCCAATACGACCAAATCCG) e human beta-2-microglobulin (hβ2M) (*sense*: ATGAGTATGCCTGCCGTGTG; *antisense*: CAAACCTCCATGATGCTGCTT). Sequência específica dos *primers* da regucalcina é *sense*: ATGAGTATGCCTGCCGTGTG; *antisense*: CAAACCTCCATGATGCTGCTT. Cada reação de qPCR continha *iTaq universal SYBR Green supermix*, *primer sense* e *anti-sense* e 1µl de cDNA, sendo o volume final de 20µl. Os valores de expressão normalizados foram calculados segundo o modelo matemático proposto por Pfaffl usando a fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl 2001).

3.4. Análise estatística

Todos os dados experimentais são mostrados como média \pm SEM. A significância estatística das diferenças na expressão de mRNA RGN entre os diferentes grupos experimentais foi avaliada por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. A análise de dados foi realizada usando *Data GraphPad Prism version 5.00* para o *Windows* (*GraphPad Software*, San Diego California USA). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0.05$.

Capítulo IV

4. Resultados e discussão

A regulação da expressão do mRNA RGN é exercida por vários fatores como 17 β -estradiol (Maia et al. 2008) e cálcio (Shimokawa & Yamaguchi 1992; Vaz et al. 2015).

A carcinogénese é fortemente dependente da estimulação estrogénica e androgénica (Debes & Tindall 2002) e alterações na homeostasia e sinalização do cálcio (Prevarskaya et al. 2014). Devido a estudos que comprovam as variações da expressão da regucalcina (Maia et al. 2008; Maia et al. 2009) e o papel importante da vitamina D no cancro da próstata (Deeb et al. 2007; Wilson et al. 2012; Zeljic et al. 2017), propusemos o estudo dos efeitos da vitamina D na expressão da regucalcina na patologia.

4.1. Extração de RNA total das linhas celulares

Para este trabalho, estabelecemos um total de três linhas celulares da próstata, sendo duas delas linhas neoplásicas da próstata (LnCap e PC-3) e uma linha não-neoplásica da próstata (PNT1A). LNCaP é uma linha celular derivada da lesão metastática do nódulo linfático do cancro de próstata humano e é positivo para o RA, exibindo crescimento sensível a androgénios (Castanares et al. 2016). PC-3 provém de metáteses do osso do cancro da próstata. Não respondem a androgénios e têm um grande potencial de metástase em comparação as LNCaP, que tem pouco potencial metastático (Tai et al. 2011). Em vários estudos recentes do nosso grupo, foi observado a expressão de mRNA RGN em linhas celulares PNT1A, PC-3 e LnCap. Com os resultados obtidos, mRNA RGN apresentava maior expressão em PNT1A e menor expressão em LnCap (Vaz et al. 2015), comprovando que a perda de expressão de RGN está associada à progressão do cancro da próstata (Maia et al. 2009; Vaz et al. 2014).

Para além das escolha das linhas celulares a serem usadas, foi também estabelecido o uso de dois tipos de soro nos ensaios para este estudo, FBS e Ch. FBS contém uma matriz complexa de componentes proteicos que são exigidos por diversos tipos de células para crescer, sendo usado com sucesso em cultura de células. Ch remove materiais não polares, tais como materiais lipofílicos (vírus, certos fatores de crescimento, hormonas e citocinas) independentemente do peso molecular.

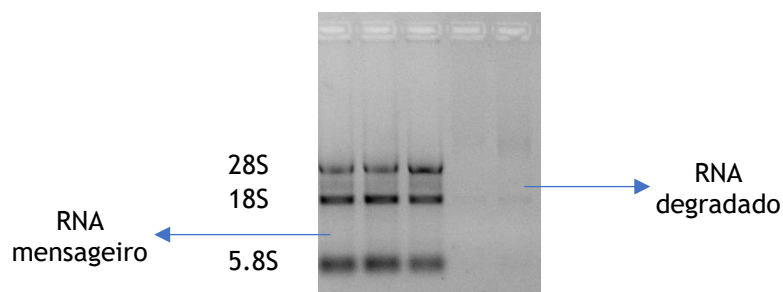


Figura 12 - Representação de resultados de eletroforese em gel e correspondência das subunidades às bandas. As primeiras três amostras demonstram as três bandas, confirmando que contém RNA integro. Nas últimas amostras exemplificam amostras com RNA degradado. Para além das bandas, também se observa *smears* (ou arrastamento) que corresponde aos diferentes RNA mensageiros das amostras.

Após o estímulo da vitamina D, foi realizado a extração de RNA. Os resultados das eletroforeses, para a confirmação da integridade do RNA total, está representadona figura 13. Para ter a confirmação que as amostras contém RNA integro, a corrida da amostra de eletroforese tem de apresentar três bandas significativas.

Os ribossomas eucariotas apresentam 3 moléculas diferentes de RNA ribossomal: 5.8S, 18S e 28S. Devido a existir inúmeros ribossomas nas células, estas três moléculas apresentam-se em bandas intensas na corrida em eletroforese, como se pode observarna figura 12. Nas amostras em que não se observam as bandas foram excluídas para a realização de qPCR.

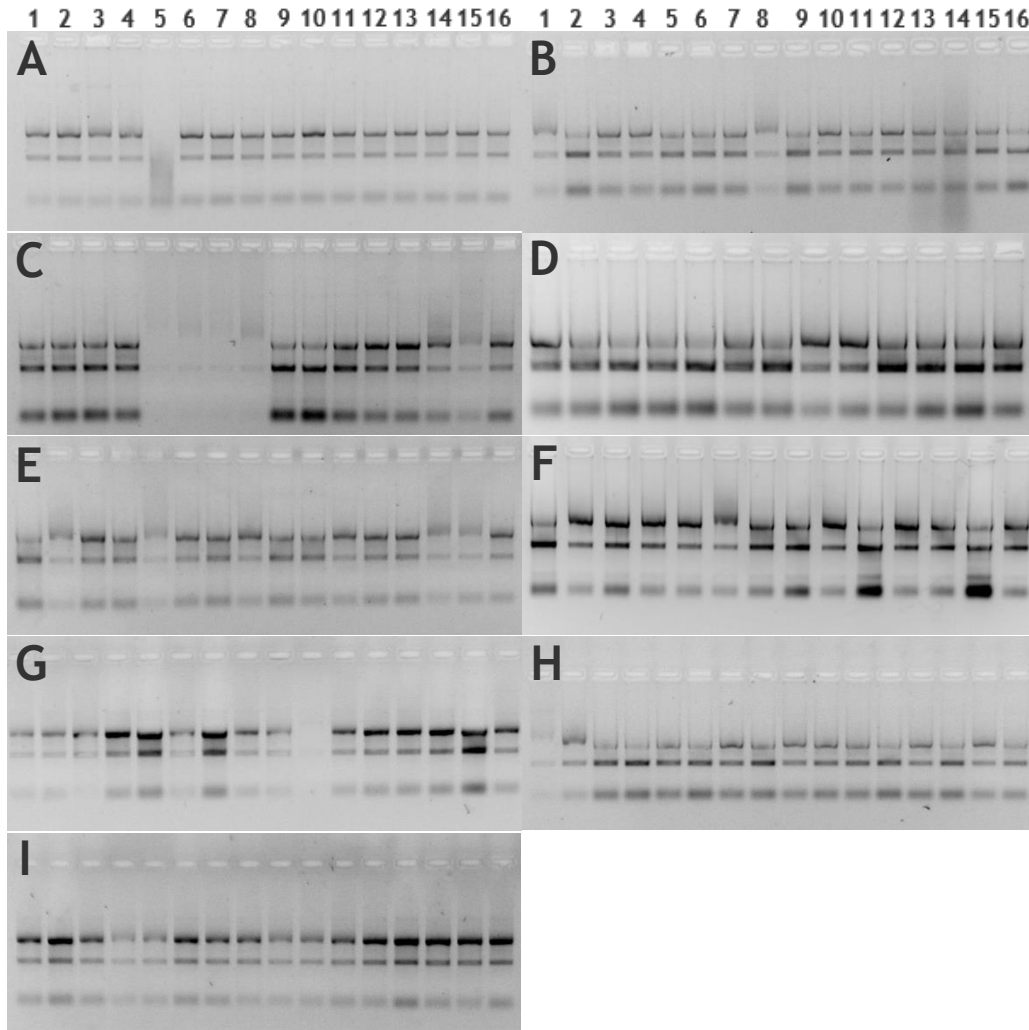


Figura 13- Imagens de confirmação da integridade de RNA, por eletroforese em gel de agarose. Imagens estão estipuladas com diferentes letras devido a pertencer a diferentes linhas e tempos de estímulos. A- PNT1A- 3h; B-PNT1A - 6h; C-PNT1A - 12h; D- LnCap - 3h; E - LnCap - 6h; F -LnCap - 12h; G - PC3 - 3h; H-PC3 - 6h; I-PC3 - 12h. Todas as amostras das imagens estão ordenadas da seguinte forma (da esquerda para a direita e n=4): FBS 0nM (amostras de 1 a 4); FBS 10nM (amostras de 5 a 8); Ch 0nM (amostras de 9 a 12); Ch 10nM (amostras de 12 a 16).

4.2. Avaliação do efeito da modulação pela vitamina D na expressão da regucalcina em linhas celulares da próstata humana

A expressão da RGN na presença ou ausência de Vitamina D em linhas celulares de próstata humana foi analisada por qPCR e normalizada com a expressão dos *housekeeping*s GAPDH e hB2M.

Avaliando o gráfico da expressão da RGN na linha não-neoplásica PNT1A (figura 14), observamos uma diminuição da expressão do mRNA RGN nas amostras estimuladas com vitamina D, ao longo do tempo. No gráfico, em estados iniciais de estímulo com a vitamina D (amostras de 3h) há uma grande expressão da RGN nas amostras em comparação ao controlo (FBS). Ao longo do tempo, quando comparamos as amostras de 6h, parece haver uma diminuição da expressão da RGN nas amostras para mais de metade. Por último, as amostras de 12h, parece continuar a haver uma enorme diminuição da expressão da proteína. Inicialmente existe regulação positiva da vitamina D na expressão da regucalcina. Ao longo do tempo, os níveis de regucalcina vão diminuindo, levando a uma regulação negativa do seu mRNA às 6h e 12h de estimulação. Como observado noutros estudos, a diminuição da expressão da RGN promove a proliferação celular, síntese de DNA e suprime a apoptose (Marques et al. 2014; Zeljic et al. 2017).

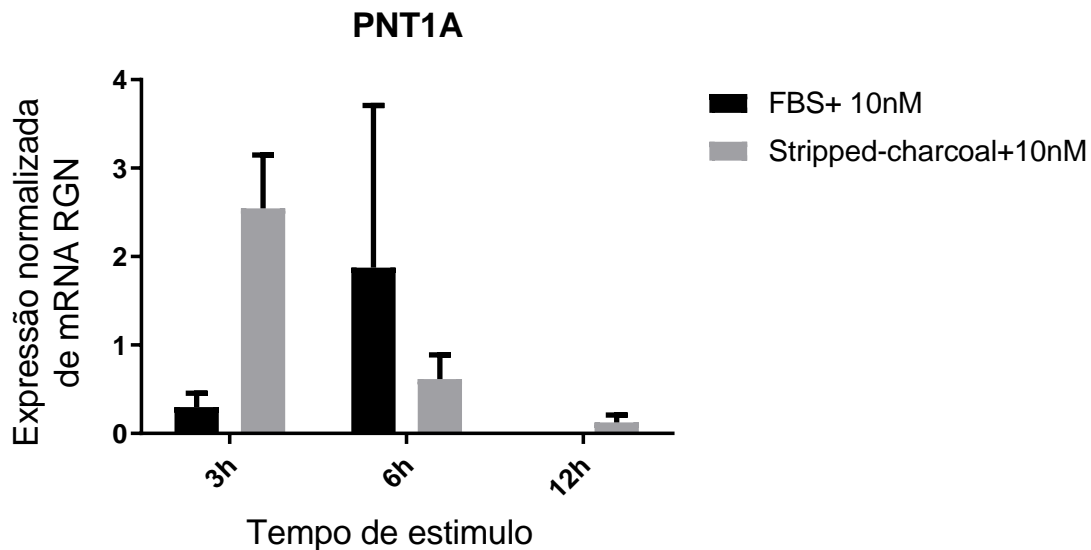


Figura 14- Efeitos da vitamina D na expressão da RGN em PNT1A. Linha foi cultivada até ter uma confluência adequada e estimulada com vitamina D a 3h, 6h e 12h. Foi extraído o RNA de cada amostra para ser avaliado através do qPCR. Os resultados são expressos como média \pm SEM (n=4).

Em relação aos resultados da linha LnCap, observamos uma baixa expressão de RGN em amostras de 3h. Ao longo do estímulo, as amostras de 6h parecem ter uma expressão mais alta, mas não significativa, sugerindo uma pequena regulação positiva da vitamina D. Inicialmente aparenta haver estímulo da vitamina D na expressão da regucalcina, mas ao longo do tempo esta vitamina tem uma regulação negativa na regucalcina. Em amostras de 12h, continua a haver um aumento da expressão da regucalcina, mas não significativa. A vitamina D em estados iniciais do cancro da próstata (representação feita pelas LnCaP) tenta regredir este cancro, mas ao longo do tempo não tem qualquer efeito. A razão de a vitamina D possivelmente não conseguir atuar em estados iniciais do cancro da próstata ainda não existe evidências concretas (Jacobs et al. 2016).

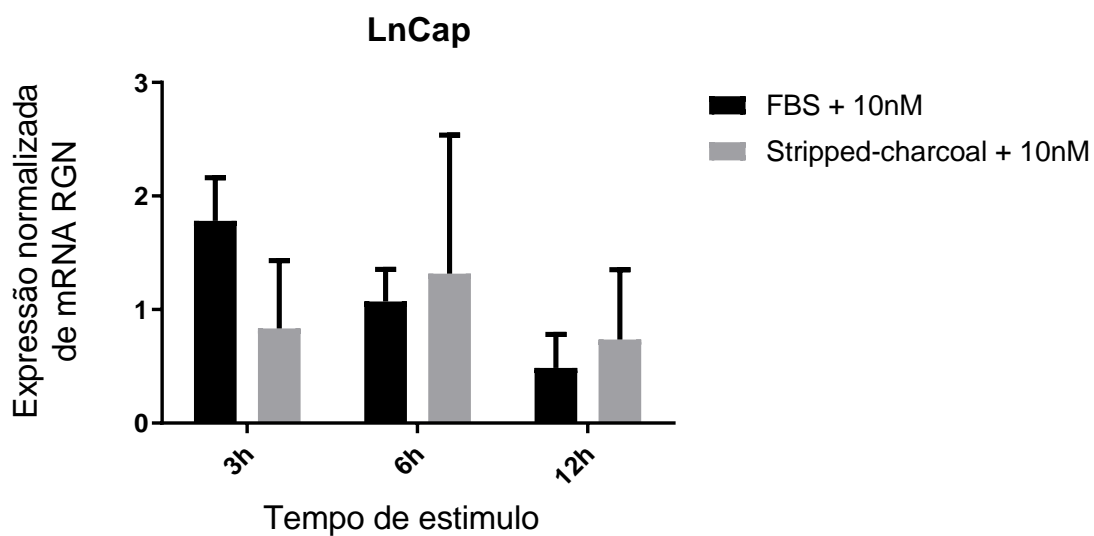


Figura 15- Efeitos da vitamina D na expressão da RGN em LnCap. Linha foi cultivada até ter uma confluência adequada. Estimulada com vitamina D a 3h,6h e 12h. Foi extraído o RNA de cada amostra para ser avaliado através do qPCR. Os resultados são expressos como média \pm SEM (n=4).

Baixos níveis de vitamina D estão associados com estados mais agressivos de cancro da próstata, isto é, quando a patologia não responde a androgénios (Ahonen et al. 2000; Gilbert et al. 2012). De acordo com a análise de qPCR da linha PC-3 (linha representativa de estados tardios do cancro da próstata), há um aumento da expressão da RGN das amostras com a presença de vitamina D (figura 16), propondo haver um aumento da expressão da RGN em estados mais tardios do cancro da próstata. Este aumento da RGN origina a supressão da proliferação celular e estimulação da apoptose (Nakagawa et al. 2005; Yamaguchi 2005).

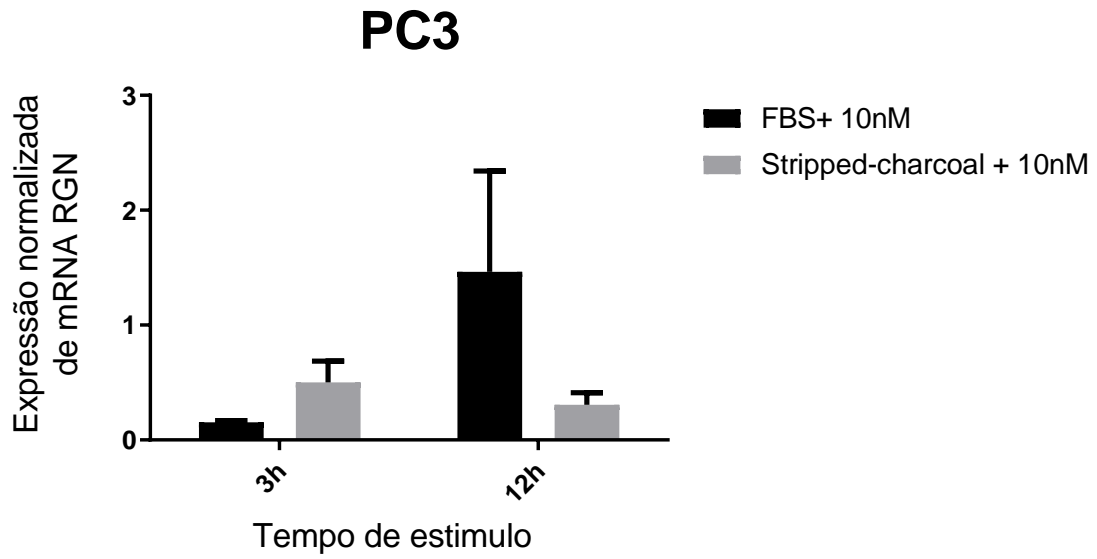


Figura 16 - Efeitos da vitamina D na expressão da RGN em PC-3. Linha foi cultivada até ter uma confluência adequada. Estimulada com vitamina D a 3h e 12h. Devido a não haver quantidade de amostra suficiente para a realização de qPCR, eliminamos as amostras de 6h. Foi extraído o RNA de cada amostra para ser avaliado através do qPCR. Os resultados são expressos como média \pm SEM (n=4).

Capítulo V

5. Conclusões e perspectivas futuras

Com os resultados obtidos, aparenta haver efeitos da vitamina D na modulação da regucalcina, mas apenas em certas fases do cancro da próstata.

Atualmente, diversos estudos relataram uma associação inversa significativa entre vitamina D e o cancro da próstata mais avançados, o que pode sugerir que a vitamina D tem um efeito inibitório na progressão do cancro e/ou que pode ser crítica na via da carcinogénese (Gilbert et al. 2012; Jacobs et al. 2016; Shui et al. 2012). Com este trabalho prático podemos ter mais uma prova que a vitamina D poderá, através do aumento dos níveis da RGN, regredir a agressividade e a progressão do cancro da próstata em estado tardio. Em relação a estados iniciais do cancro da próstata, a vitamina D parece ter ação quando se contacta com as células cancerígenas, mas ao longo do tempo a sua ação é baixa/nula/negativa na regulação da expressão da RGN. Como tal, considera-se esta pesquisa o passo inicial para a descoberta de mais uma propriedade anticancerígena da vitamina D e de mais um fator de regulação da regucalcina.

Este trabalho prático, teve como objetivo verificar se a vitamina D poderá ter alguma ação na regulação da regucalcina. Com os resultados que obtivemos e do que foi executado, não conseguimos determinar com certeza a ação da vitamina D na regulação desta proteína. Possivelmente, repetir novamente todos os ensaios e o qPCR, poderia ser uma boa aposta. Para além desta repetição, com os mesmos ensaios, a execução de *Western Blot* para a determinação da expressão da proteína deve ser feita para finalizar o primeiro objetivo deste trabalho.

O segundo objetivo inicial deste trabalho prático era também determinar o efeito da vitamina D na proliferação celular e apoptose em linhas celulares humanas da próstata na presença e na ausência da regucalcina. Esta presença e ausência da RGN era conseguida através do uso de SiRNA (*Scramble* e RGN SiRNA). PNT1A seria a linha ideal devido a possuir níveis altos de regucalcina e por ser uma linha não neoplásica. Para este objetivo, a avaliação era feita através de ensaios de MTS (Proliferação) e ensaios de apoptose (Caspase 3 ou TUNEL).

Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

- Aaron, L.T., Franco, O.E. & Hayward, S.W., 2016. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urologic Clinics of North America*, 43(3), pp.279-288.
- Agarwal, R., 2000. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochemical pharmacology*, 60(8), pp.1051-1059.
- Ahonen, M. et al., 2000. Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland). *Cancer Causes Control*, 11, pp.847-52.
- Attard, G. et al., 2016. Prostate cancer. *The Lancet*, 387(10013), pp.70-82.
- Barbieri, C.E. & Tomlins, S.A., 2015. Reprint of: The prostate cancer genome: Perspectives and potential. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 33(2), pp.95-102.
- Berridge, M.J., Lipp, P. & Bootman, M.D., 2000. The versatility and universality of calcium Signalling. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 1(1), pp.11-21.
- Bosch, J.L.H. et al., 2007. Establishing Normal Reference Ranges for Prostate Volume Change With Age in the Population-Based Krimpen-Study: Prediction of Future Prostate Volume in Individual Men. *The Prostate*, 67, pp.1816-1824.
- Brum, I. et al., 2003. Androgen-dependent expression of c-jun and c-fos in human non-transformed epithelial prostatic cells (HNTEP): association with cell proliferation. *Horm Res*, 60(5), pp.209-214.
- Brum, I. et al., 2001. Androgen-induced cell growth and c-myc expression in human non-transformed epithelial prostatic cells in primary culture. *Endocrine Res*, 27, pp.153-169.
- Castanares, M.A. et al., 2016. Characterization of a Novel Metastatic Prostate Cancer Cell Line of LNCaP Origin. , 76(2), pp.215-225.
- Center, M.M. et al., 2012. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *European Urology*, 61(6), pp.1079-1092.
- Chakraborti, S. & Bahnson, B.J., 2010. Crystal Structure of Human Senescence Marker Protein 30; Insights Linking Structural, Enzymatic and Physiological Functions. *Biochemistry*, 49(16), pp.3436-3444.
- Chen, N. & Zhou, Q., 2016. The evolving Gleason grading system. *Chinese Journal of Cancer Research*, 28(1), pp.58-64.
- Christakos, S. et al., 2016. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological Reviews*, 96(1), pp.365-408.
- Collins, A.T. et al., 2005. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Research*, 65(23), pp.10946-10951.
- Cucuzza, L. et al., 2015. Regucalcin Expression as a Diagnostic Tool for the Illicit Use of Steroids in Veal Calves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(23), pp.5702-5706.
- Daniyal, M. et al., 2014. Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer.

- Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(22), pp.9575-9578.
- Debes, J.D. & Tindall, D.J., 2002. The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Letters*, 187(1-2), pp.1-7.
- Deeb, K.K., Trump, D.L. & Johnson, C.S., 2007. Vitamin D signalling pathways in cancer: Potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 7(9), pp.684-700.
- Dunn, M.W. & Kazer, M.W., 2011. Prostate cancer overview. *Seminars in Oncology Nursing*, 27(4), pp.241-250.
- Feldman, B.J. & Feldman, D., 2001. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature reviews. Cancer*, 1(1), pp.34-45.
- Feldman, D. et al., 2014. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nature Reviews Cancer*, 14(5), pp.342-357.
- Fernandez, A. et al., 2001. Angiogenic potential of prostate carcinoma cells overexpressing bcl-2. *J Natl Cancer Inst*, 93(3), pp.208-213.
- Fishman, S.J., 1987. Functional Anatomy of Reproduction. In *DisClosure*. pp. 1-12.
- Gann, P.H., 2002. Risk factors for prostate cancer. *Reviews in urology*, 4(5), pp.S3-S10.
- Gilbert, R. et al., 2012. Associations of circulating 25-hydroxyvitamin D with prostate cancer diagnosis, stage and grade. *International Journal of Cancer*, 131(5), pp.1187-1196.
- Girgis, C.M. et al., 2013. The roles of vitamin D in skeletal muscle: Form, function, and metabolism. *Endocrine Reviews*, 34(1), pp.33-83.
- Gleason, D., 1977. Histologic grading and clinical staging of prostate carcinoma. *Urologic pathology: the prostate.*, pp.171-98.
- Grasso, C.S. et al., 2012. The Mutational Landscape of Lethal Castrate Resistant Prostate Cancer. *Nature*, 487(7406), pp.239-243.
- Haffner, M.C. et al., 2013. Tracking the clonal origin of lethal prostate cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 123(11), pp.4918-4922.
- Handa, S., Maruyama, N. & Ishigami, A., 2009. Over-expression of senescence marker protein-30 decreases reactive oxygen species in human hepatic carcinoma Hep G2 cells. *Biol Pharm Bull*, 32, pp.1645-1648.
- Hausler, M.R. et al., 1998. The nuclear vitamin D receptor: Biological and molecular regulatory properties revealed. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(3), pp.325-349.
- Horng, C.-T. et al., 2017. Effect of Carvacrol on Ca²⁺ Movement and Viability in PC3 Human Prostate Cancer Cells. *The Chinese Journal of Physiology*, 60(5), pp.275-283.
- Di Ilio, C. et al., 1990. Glutathione transferase isoenzymes from human prostate. *Biochem J*, 271, pp.481-485.
- Imamura, Y. & Sadar, M.D., 2016. Androgen receptor targeted therapies in castration-resistant prostate cancer: Bench to clinic. *International Journal of Urology*, 23(8), pp.654-665.
- Izumi, T. & Yamaguchi, M., 2004. Overexpression of regucalcin sup- presses cell death in cloned rat hepatoma H4-II-E cells induced by tumor necrosis factor-alpha or

- thapsigargin. *J Cell Biochem*, 92(2), pp.296-306.
- Jacobs, E.T. et al., 2016. Vitamin D and colorectal, breast, and prostate cancers: A review of the epidemiological evidence. *Journal of Cancer*, 7(3), pp.232-240.
- Javed, S. & Langley, S.E.M., 2014. Importance of HOX genes in normal prostate gland formation, prostate cancer development and its early detection. *BJU International*, 113(4), pp.535-540.
- Laurentino, S.S. et al., 2012. Regucalcin, a calcium-binding protein with a role in male reproduction? *Molecular Human Reproduction*, 18(4), pp.161-170.
- Lee, C.H., Akin-Olugbade, O. & Kirschenbaum, A., 2011. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 40(3), pp.565-575.
- Lehen'kyi, V. et al., 2011. TRPV6 determines the effect of vitamin D3 on prostate cancer cell growth. *PLoS ONE*, 6(2).
- Lin, X. et al., 2001. GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am J Pathol*, 159, pp.1815-1826.
- Maia, C. et al., 2009. Regucalcin is under-expressed in human breast and prostate cancers: Effect of sex steroid hormones. *Journal of Cellular Biochemistry*, 107(4), pp.667-676.
- Maia, C.J.B. et al., 2008. Regucalcin is expressed in rat mammary gland and prostate and down-regulated by 17 β -estradiol. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 311(1-2), pp.81-86.
- Maly, I. V & Hofmann, W.A., 2018. Calcium and Nuclear Signaling in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*, 19(4).
- Marques, R. et al., 2014. The diverse roles of calcium-binding protein regucalcin in cell biology: From tissue expression and signalling to disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(1), pp.93-111.
- De Marzo, A.M. et al., 2013. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), pp.256-269.
- De Marzo, A.M. et al., 2004. Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: Implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment. *Journal of Cellular Biochemistry*, 91(3), pp.459-477.
- De Marzo, A.M. et al., 1999. Proliferative Inflammatory Atrophy of the Prostate. *The American Journal of Pathology*, 155(6), pp.1985-1992.
- McNeal, J., 1984. Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 145, pp.27-53.
- McNeal, J., 1972. The prostate and prostatic urethra: a morphologic synthesis. *J Urol*, 107, pp.1008-1016.
- McNeal, J., 1981. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*, 2, pp.35-49.
- McNeal JE, Stamey TA, H.K., 1988. The prostate gland: morphology, pathology, ultrasound anatomy. *Monogr. Urol.*, 9, pp.36-54.
- Meiers, I., Shanks, J.H. & Bostwick, D.G., 2007. Glutathione S-transferase pi (GSTP1)

- hypermethylation in prostate cancer: Review 2007. *Pathology*, 39(3), pp.299-304.
- Miller, G.J. et al., 2003. Aberrant HOXC Expression Accompanies the Malignant Phenotype in Human Prostate Aberrant HOXC Expression Accompanies the Malignant Phenotype in. , (33), pp.5879-5888.
- Misawa, H. & Yamaguchi, M., 2001. Molecular cloning and sequencing of the cDNA coding for a novel regucalcin gene promoter region-related protein in rat, mouse and human liver. *Int J Mol Med*, 8, pp.513-520.
- Murata, T. & Yamaguchi, M., 1998. Ca²⁺ administration stimulates the binding of AP-1 factor to the 5-flanking region of the rat gene for the Ca²⁺-binding protein regucalcin. *Biochem J*, 329(Pt 1), pp.157-163.
- Nakagawa, T., Sawada, N. & Yamaguchi, M., 2005. Overexpression of regucalcin suppresses cell proliferation of cloned normal rat kidney proximal tubular epithelial NRK52E cells. *Int J Mol Med*, 16(4), pp.637-643.
- Nejak-Bowen, K. et al., 2009. Beta-catenin regulates vitamin C biosynthesis and cell survival in murine liver. *J Biol Chem*, 284, pp.28115-28127.
- Omabe, M. & Ezeani, M., 2011. Infection, inflammation and prostate carcinogenesis. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(6), pp.1195-1198.
- Packer, J.R. & Maitland, N.J., 2016. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(6), pp.1238-1260.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), p.45e-45.
- Pilz, S. et al., 2018. Vitamin D: Current Guidelines and Future Outlook. *Anticancer Research*, 38(2), pp.1145-1151.
- Powis, G. & Phil, D., 1994. Inhibitors of phosphatidylinositol signalling as antiproliferative agents. *Cancer Metastasis Rev*, 13, pp.91-105.
- Prevarskaya, N. et al., 2014. Remodelling of Ca²⁺ transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1638), pp.20130097-20130097.
- RORENO, 2010. Registo oncológico nacional 2010. , p.144. Available at: http://www.roreno.com.pt/images/stories/pdfs/ro_nacional_2010.pdf.
- Sfanos, K.S., Hempel, H.A. & Marzo, A.M. De, 2014. Inflammation and Cancer. , 816, pp.153-181. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-0348-0837-8>.
- Sfanos, K.S. & de Marzo, A.M., 2012. Prostate cancer and inflammation: The evidence. *Histopathology*, 60(1), pp.199-215.
- Shimokawa, N. & Yamaguchi, M., 1992. Calcium administration stimulates the expression of calcium-binding protein regucalcin mRNA in rat liver. *FEBS Letters*, 305(2), pp.151-154.
- Shui, I.M. et al., 2012. Vitamin D-related genetic variation, plasma vitamin D, and risk of lethal prostate cancer: A prospective nested case-control study. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(9), pp.690-699.
- Tai, S. et al., 2011. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma.

- Prostate*, 71(15), pp.1668-1679.
- Takeshita, A., Ozawa, Y. & Chin, W., 2000. Nuclear receptor coactivators facilitate vitamin D receptor homodimer action on direct repeat hormone response elements. *Endocrinology*, 141(3), pp.1281-4.
- Taverna, G. et al., 2015. Inflammation and prostate cancer: friends or foe? *Inflamm. Res.*, 64, pp.275-286.
- Theophilou, G. et al., 2015. A biospectroscopic analysis of human prostate tissue obtained from different time periods points to a trans-generational alteration in spectral phenotype. *Scientific Reports*, 5(June), pp.1-13.
- Udensi, U.K. & Tchounwou, P.B., 2016. Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 35(1), pp.1-19.
- Vaz, C. V. et al., 2015. Effect of extracellular calcium on regucalcin expression and cell viability in neoplastic and non-neoplastic human prostate cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(10), pp.2621-2628. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.07.006>.
- Vaz, C. V. et al., 2014. Regucalcin is an androgen-target gene in the rat prostate modulating cell-cycle and apoptotic pathways. *Prostate*, 74(12), pp.1189-1198.
- Wang, W.-L.W. & Tenniswood, M., 2014. Vitamin D, intermediary metabolism and prostate cancer tumor progression. *Frontiers in Physiology*, 5(May), pp.1-9. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2014.00183/abstract>.
- Wasilenko, W.J. et al., 1997. Calcium signaling in prostate cancer cells: evidence for multiple receptors and enhanced sensitivity to bombesin/GRP. *Prostate*, 30(3), pp.167-173.
- Wilson, K.M., Giovannucci, E.L. & Mucci, L.A., 2012. Lifestyle and dietary factors in the prevention of lethal prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*, 14(3), pp.365-374.
- Yamaguchi, M. et al., 2016. Prolonged survival in hepatocarcinoma patients with increased regucalcin gene expression: HepG2 cell proliferation is suppressed by overexpression of regucalcin in vitro. *International Journal of Oncology*, 49(4), pp.1686-1694.
- Yamaguchi, M., 2005. Role of regucalcin in maintaining cell homeostasis and function (review). *International journal of molecular medicine*, 15(3), pp.371-389.
- Yamaguchi, M. et al., 2017. Survival of lung cancer patients is prolonged with higher regucalcin gene expression: suppressed proliferation of lung adenocarcinoma A549 cells in vitro. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 430(1-2), pp.37-46.
- Yamaguchi, M., Mori, S. & Kato, S., 1998. Yamaguchi M, Mori S, Kato S. Calcium-binding protein regucalcin is an activator of (Ca²⁺-Mg²⁺)-adenosine triphosphatase in the plasma membranes of rat liver. *Chem Pharm Bull*, 36, pp.3532-3539.
- Zeljic, K., Supic, G. & Magic, Z., 2017. New insights into vitamin D anticancer properties: focus on miRNA modulation. *Molecular Genetics and Genomics*, 292(3), pp.511-524.
- Ziaraan, S. et al., 2015. Biomarkers for determination prostate cancer: implication for diagnosis and prognosis. *Neoplasma*, 62(5), pp.683-691.