ANA MARIA CRISTINA RABELLO PINTO DA FONSECA MARTINS

**Estudo retrospectivo-sistemático e análise
quantitativa da proliferação celular e apoptose;
identificação da proteína conexina 43 e 26
aberrante em glândula perianal normal,
hiperplásica e neoplásica em cães**

São Paulo
2006

ANA MARIA CRISTINA RABELLO PINTO DA FONSECA MARTINS

**Estudo retrospectivo-sistemático e análise quantitativa
da proliferação celular e apoptose; identificação da proteína
conexina 43 e 26 aberrante em glândula perianal normal,
hiperplásica e neoplásica em cães**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Patologia Experimental e Comparada da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia Experimental e Comparada

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador

Prof. Dr. José Luiz Guerra

São Paulo
2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1701
FMVZ

Martins, Ana Maria Cristina Rabello Pinto da Fonseca

Estudo retrospectivo-sistemático e análise quantitativa da proliferação celular e apoptose; identificação da proteína conexina 43 e 26 aberrante em glândula perianal normal, hiperplásica e neoplásica em cães / Ana Maria Cristina Rabello Pinto da Fonseca Martins.- São Paulo: A. M. C. R. P. F. Martins, 2006.
107 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Guerra.

1. Proliferação celular. 2. Apoptose. 3. Glândula perianal.
4. Carcinogênese. 5. Conexina. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Estudo retrospectivo – sistemático e análise quantitativa da proliferação celular e apoptose e identificação da expressão de conexina 43 e 26 aberrante em glândula perianal, hiperplásica e neoplásica em cães”, protocolo nº899/2006, utilizando 26 (vinte e seis) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Luiz Guerra, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião do dia 17/05/2006.

(We certify that the Research “Retrospective – systematic study and quantitative analysis of the cellular proliferation and apoptosis and identification of protein connexin 43 and aberrant 26 in normal, hyperplasic and neoplastic perianal glands in dogs”, protocol number 899/2006, utilizing 26 (twenty six) dogs, under the responsibility of Prof. Dr. José Luiz Guerra, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting on the 17th of May of 2006).

São Paulo, 18 de maio de 2006

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MARTINS, Ana Maria Cristina Rabello Pinto da Fonseca

Título: Estudo retrospectivo-sistemático e análise quantitativa da proliferação celular e apoptose; identificação da proteína conexina 43 e 26 aberrante em glândula perianal normal, hiperplásica e neoplásica em cães

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Patologia Experimental e Comparada da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

**Para ser grande, sê inteiro: nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda brilha porque alta vive.**
Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer agradecimento àqueles que tanto me ajudaram na elaboração deste trabalho, devo elevar meu pensamento à Ele pois sem a inspiração e ajuda superior nada teria realizado.

Devo, por um critério lógico, agradecer às pessoas que desinteressadamente me orientaram e nortearam meu caminho para a concretização de meu projeto.

Assim, não devo omitir nenhum nome dos que me ajudaram, especialmente meu orientador e amigo querido, Professor José Luiz Guerra, que mesmo assoberbado com seus compromissos profissionais e particulares conseguiu dar-me todo o apoio para que pudesse realizar um sonho : a oportunidade de crescer profissional e intelectualmente .

Agradeço, com a mesma ênfase, à Professora Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, que contribuiu profundamente na realização do trabalho e, principalmente, por todo o arrimo e conhecimentos em Biologia Molecular que tanto se fizeram necessários para o desenvolvimento e conclusão de minha tese.

Agradeço também a Silvia e José Luis, pela incansável colaboração dada a mim, nas horas de dúvidas.

Não poderia deixar de agradecer por idéias, conceitos, apoio moral, companheirismo e bons momentos à Amanda, Heidge, Tereza, Marcelo, Patrícia, Viviane (Vivi) , Lucas .

E em especial, pelo apoio e persistência, agradeço a Cíntia, Marguite, Cláudio e Luciano, sem os quais teria sido impossível a realização de qualquer trabalho laboratorial.

Peço desculpas aos meus por falhas, estresses e ausências eventuais.

Muito obrigada

RESUMO

MARTINS, A. M. C. R. P. F. **Estudo retrospectivo-sistemático e análise quantitativa da proliferação celular e apoptose; identificação da proteína conexina 43 e 26 aberrante em glândula perianal normal, hiperplásica e neoplásica em cães.** [Retrospective - systematic study and quantitative analysis of the cellular proliferation and apoptosis and identification of protein connexin 43 and aberrant 26 in normal, hyperplasic and neoplastic perianal glands in dogs)]. 2006, 107f. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Duzentos e quarenta e cinco neoplasias de glândula perianal de cães dos arquivos do Departamento de Patologia da FMVZ/ USP, de 1984 à 2004, foram revisadas histologicamente. A grande maioria dos casos (34%) foi classificada como adenoma moderadamente diferenciado, grupo II, em machos com mais de oito anos de idade o que reflete a dependência androgênica dessas neoplasias. A análise quantitativa da proliferação celular e apoptose nos diferentes tipos histológicos de neoplasias, hiperplasia e tecido normal dessas glândulas determinou um padrão paralelo de aumento de ambas as quantificações. Com os resultados do índice de crescimento ajustado obtivemos que, embora os carcinomas tenham um nível de proliferação celular muito maior que os adenomas (grupo I), esses têm um potencial de crescimento maior, levando-se em conta a apoptose. Investigamos, também, a expressão de Cx43, 26 e 32 nessas glândulas perianais com métodos imunoistoquímicos. A Cx 43 expressava-se em glândulas perianais normais, hiperplásicas, adenomas (grupo I) e adenomas moderadamente diferenciados. Nos adenomas pouco diferenciados (grupo II), a expressão estava reduzida e não se expressava nos carcinomas (grupo III). A Cx 26 acumulava-se no citoplasma nas glândulas normais, hiperplásicas, adenomas (grupo I) e adenomas moderadamente diferenciados (grupo II). Nos adenomas pouco diferenciados (grupo II), a expressão estava reduzida e, ausente, nos carcinomas. A Cx 32 não foi identificada em nenhum dos grupos (I, II e III) ou glândulas normais e hiperplásicas. Concluindo, Cx 43 e Cx26 são importantes para a homeostasia de glândula perianal normal, podendo estar associadas aos receptores de andrógenos presentes em suas células. Este foi o primeiro estudo mostrando a apoptose e sua influência na fase promocional da carcinogênese e, também, o primeiro estudo mostrando a expressão de Cx43, Cx 26 citoplasmática e ausência de expressão da Cx 32 em glândulas perianais normais, hiperplásicas e neoplásicas em cães.

Palavras – chave: Proliferação celular, Apoptose, Glândula perianal, Carcinogênese, Conexina

ABSTRACT

MARTINS, A.M.C.R.P.F. **Retrospective - systematic study and quantitative analysis of the cellular proliferation and apoptosis and identification of connexin 43 and aberrant 26 protein in normal, hyperplasic and neoplastic perianal glands in dogs.** [Estudo retrospectivo-sistemático e análise quantitativa da proliferação celular e apoptose; identificação da proteína conexina 43 e 26 aberrante em glândula perianal normal, hiperplásica e neoplásica em cães] 2006, 107 f. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Two hundred and forty five neoplasms of the perianal glands of dogs from the archives of the Department of Pathology of the FMVZ/USP, 1984 to 2004, have been reviewed hystologically. Most of the cases (34%) were classified as moderately differentiated adenomas, group II, in males over 8 years of age, which showed an androgenic dependence of these neoplasms. The quantitative analysis of the cellular proliferation and apoptosis, in the different hystologic types of neoplasia, hyperplasia and normal tissue of these glands, determined a parallel pattern of increase in both quantifications. The values of the net growth index showed that although carcinomas have a much higher level of proliferation than adenomas (group I), these latter have a much higher potential of growth, taking into account the effect of the apoptosis. The occurrence of Cx 43, 26 and 32 in these perianal glands was also investigated by immunohistochemical methods. Cx 43 expression was present in normal, hyperplasic, adenomas (group I) and moderately differentiated adenomas perianal glands. In poorly differentiated adenomas (group II), the expression was reduced and was absent in carcinomas. Cx 26 was accumulated in the cytoplasm in normal, hyperplasic, adenomas (group I) and moderately differentiated adenomas glands. In poorly differentiated adenomas (group II), the expression was reduced and was absent in carcinomas. Cx 32 was not found in all groups (I, II, III), normal and hyperplasic glands. In conclusion, Cx 43 and Cx 26 are important for homeostasis of normal canine perianal glands, being able to be associated with the androgen receptors present in their cells. This was the first study showing the apoptosis and its influence on the promotional phase of carcinogenesis and, also, the first study showing the occurrence of Cx 43, cytoplasmatic Cx 26 and no expression of Cx 32 in normal, hyperplasic and neoplastic canine perianal glands.

Key words: Cellular proliferation, Apoptosis, Perianal gland, Carcinogenesis, Connexin

TERMOS EM INGLÊS

Na literatura científica encontramos termos em inglês de tal forma enraizados e conhecidos que perderiam seu sentido se traduzidos ao português. Optamos por manter esses termos em sua forma original.

Background = constituição genética.

Bystander effect = capacidade de se fazer passar substâncias tóxicas, através das junções comunicantes do tipo gap a fim de matar célula tumoral.

cDNA = fita de ácido desoxirribonucléico complementar a ácido ribonucléico que contém a mensagem que codifica para determinada proteína.

CpG island = pequena extensão de DNA na qual a frequência de sequência Citosina-Guanina é maior que em outras regiões. A sigla "p" indica que "C" e "G" estão conectadas por ligação fosfodiéster. Ilhas de CpG estão sempre localizadas próximas a promotores de genes essenciais às funções celulares gerais ou outros genes expressos com frequência nas células.

DNA = ácido desoxirribonucléico.

GAP = fenda

Gating = fechamento do poro formado pelas conexinas.

GJIC = JGAP= comunicação intercelular por junções do tipo gap.

siRNA = ácido ribonucléico de interferência. Transcrição de pequeno RNA com 100-300 bp que associado à proteína formam pequenas partículas de RNA nuclear, as quais participam e interferem no processamento do RNA .

Immunoblot = identificação das proteínas por anticorpos específicos após eletroforese e transferência de membrana.

Loops = alças da molécula de DNA ou no caso da conexina, alças extras e intracelulares que se dobram conectando cada domínio transmembrana.

mRNA = ácido ribonucléico que contém a informação para a codificação de determinada proteína.

Overnight = período de tempo correspondente a uma noite.

Splicing = união dos exons do pré-RNA e exclusão dos introns originando o mRNA maduro.

Western blot = método usado para identificação de proteínas, baseado em extração, eletroforese, transferência e identificação através de anticorpos e sistema de revelação.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	JUNÇÕES COMUNICANTES TIPO GAP.....	16
2.1.1	Organização molecular das junções comunicantes do tipo GAP....	16
2.1.2	Conexinas: proteínas das junções tipo GAP.....	18
2.1.3	Família de proteínas.....	20
2.1.3.1	Organização estrutural das conexinas.....	21
2.1.4	Distribuição tecidual das conexinas.....	22
2.1.5	Regulação da expressão dos genes da conexina.....	24
2.1.6	Canal juncional.....	24
2.1.6.1	Estrutura do canal juncional.....	24
2.1.6.2	Montagem dos conexons.....	27
2.1.7	Dinâmica de formação e degradação das placas juncionais.....	31
2.2	COMUNICAÇÃO INTERCELULAR VIA JUNÇÕES DO GAP.....	31
2.2.1	Propriedades dos canais juncionais.....	31
2.2.1.1	Definição da permeabilidade juncional.....	31
2.2.1.2	Modulação da montagem dos canais intercelulares.....	32
2.3	IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS DAS JUNÇÕES TIPO GAP.....	34
2.3.1	JGAP e carcinogênese.....	35
2.3.1.1	Conexina e progressão do câncer.....	35
2.3.1.2	Perda precoce da conexina na progressão tumoral.....	36
2.3.2	Função das conexinas no controle da proliferação, diferenciação e apoptose celular.....	39

2.4	A SITUAÇÃO DO ASSUNTO DE PESQUISA.....	42
2.4.1	Anatomia e histologia da região perineal em cães.....	42
2.4.2	Adenomas e carcinomas de glândula perianal.....	46
2.4.3	Incidência, Etiologia e Fatores de risco.....	47
3	OBJETIVOS.....	49
3.1	OBJETIVO GERAL.....	50
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1	MATERIAL.....	50
4.1.1	Classificação das neoplasias.....	50
4.2	MÉTODOS.....	52
4.2.1	Método de Hematoxilina – Eosina (H & E)	52
4.2.2	Método de fluorescência para se determinar os corpúsculos apoptóticos.....	52
4.2.3	Método imunoistoquímico para a quantificação da proliferação das células das glândulas perianais (PCNA).....	53
4.2.4	Método imunofluorescência para marcação das conexinas.....	54
4.2.5	Método de Western blot para conexinas 26, 32 e 43.....	55
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
4.3.1	Índice de crescimento ajustado.....	57
5	RESULTADOS.....	58
5.1	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E TIPOS DE TUMORES.....	58
5.5.1	Classificação dos arquivos de Patologia FMVZ/USP dos processos hiperplásicos e neoplásicos/OMS	58
5.5.2	Reclassificação dos processos hiperplásicos e neoplásicos/ Berrocal	59

5.5.3	Levantamento retrospectivo conforme idade, sexo e raça.....	60
5.2	QUANTIFICAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA GLÂNDULA PERIANAL.....	63
5.3	QUANTIFICAÇÃO DA APOPTOSE DAS GLÂNDULAS PERIANAIS.....	64
5.4	ANÁLISE DO ÍNDICE DE CRESCIMENTO AJUSTADO	67
5.5	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	68
5.5.1	Expressão da Conexina 43.....	68
5.5.2	Expressão da Conexina 26.....	70
5.5.3	Expressão da Conexina 32.....	72
5.6	WESTERN BLOT DA CX 43, 32, 26.....	73
5.6.1	Imunoblot para Cx 43.....	73
5.6.2	Imunoblot para Cx 26.....	73
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÕES.....	85
8	REFERÊNCIAS	86
9	APÊNDICE.....	101

1. INTRODUÇÃO

As células, nos organismos multicelulares, encontram-se organizadas em tecidos, e necessitam estar em contacto umas com as outras para originar grupos cooperativos; estes, por sua vez, estão associados em várias combinações para formar os órgãos. De acordo com a principal função que desempenham, as junções celulares podem ser classificadas como: **junções de ancoragem, junções de oclusão e junções comunicantes tipo GAP** (ALBERTS et al., 1994). As junções de ancoragem promovem a adesão de uma célula à outra ou a elementos da matriz extracelular (MEC). As junções de oclusão restringem a passagem de substâncias pelo espaço entre as células e estão presentes principalmente na pele. E, as junções comunicantes tipo GAP, **tema desta tese**, que permitem a passagem de sinais químicos ou elétricos de uma célula para outra.

As junções do tipo *gap* são as junções comunicantes mais frequentemente encontradas na maioria dos tecidos animais (à exceção da maioria das células sangüíneas, das musculares esqueléticas e grande parte das células nervosas), em praticamente todas as espécies. Tais junções não são idênticas em todos os tecidos, porém compartilham uma estrutura básica: são formadas por proteínas transmembrânicas, as conexinas, filogeneticamente conservadas (GOODENOUGH; GOLIGER; PAUL, 1996) e inseridas na membrana plasmática de maneira a formarem “túneis” interligando o citoplasma de uma célula a outro da célula adjacente. Assim, em determinado órgão, as células estão todas interconectadas por meio dessa rede, atuando de modo conjunto como uma estrutura única, conduzindo informações essenciais, com implicações funcionais e essenciais, para a manutenção da homeostasia tecidual.

Cada célula do par em comunicação contribui com a metade do canal juncional (conexon) e pelo canal, moléculas neutras ou carregadas, de dimensões variáveis e apreciáveis, atravessam-no. A baixa seletividade do canal juncional permite que várias moléculas biologicamente importantes circulem livremente de uma célula à outra em determinado tecido (GOODENOUGH; GOLIGER; PAUL, 1996).

A homeostasia tecidual é mantida pelo número de células, sua diferenciação, coordenação e adaptação a novos estímulos. Portanto a homeostasia é altamente dependente da sinalização ou comunicação entre células por meio de fatores secretados como hormônios, fatores de crescimento e citocinas (fatores extracelulares), mensageiros secundários e transduções dos sinais em cascata (comunicação intracelular) e junções intercelulares.

Alterações nas comunicações celulares levam à perda da homeostasia e portando à doença e inclusive à carcinogênese. Carcinogênese é um processo de múltiplos estágios em que uma célula simples tem bloqueada de forma irreversível sua diferenciação terminal (estágio inicial). A fase promocional é potencialmente reversível ou uma expansão clonal ininterrupta da célula iniciada pela combinação da estimulação ao crescimento e inibição da apoptose. Quando a célula iniciada sofre determinadas mutações e alterações epigenéticas tornando-se independente para estímulos de crescimento e resistentes a fatores inibitórios de crescimento e apoptose, com um potencial ilimitado de replicações e fenótipo invasivo e metastático, têm-se estabelecido à fase de progressão.

As glândulas perianais (circumanais ou hepatóides) foram descritas pela primeira vez em 1923 e são encontradas em muitas espécies de carnívoros e bovídeos (BLAZQUEZ et al., 1988; NIELSEN; ATTOSMIS, 1964; SHABADASH; ZELIKINA, 2002). Localizam-se no tecido subcutâneo, ao redor do ânus, na base da cauda e lateral do prepúcio (GOURLEY; GREGORY, 1992; MEUTEN et al., 1983). Histologicamente formam lóbulos rodeados pelas células basais, indiferenciadas e achatadas e células diferenciadas, poligonais. Essas glândulas apresentam dimorfismo sexual, sendo que nas fêmeas adultas sobrevém uma acentuada e significativa regressão com características estruturais que sugerem uma degeneração por formarem ilhas isoladas de células apócrinas e nos machos formam massas glandulares. Ainda, de acordo com Shabadash e Zelikina (1995), as glândulas perianais ou hepatóides podem ser consideradas glândulas de odor, sendo que suas proteínas abundantes cobrem a superfície da região perineal, sendo preservadas nas fezes como um marcador olfatório.

A causa dos tumores da glândula perianal é desconhecida, entretanto, podem ser modulados por hormônios sexuais (BENNETT et al., 2002; HAYES et al., 1977). Os tumores perianais freqüentemente manifestam-se clinicamente como massas aumentadas, sendo que os adenocarcinomas sempre são acompanhados por sintomas sistêmicos, principalmente poliúria e polidipsia correlacionados com hipercalcemia e hipofosfatemia (BERROCAL et al., 1989; BENNETT et al., 2002). Os adenomas perianais correspondem a mais de 80% das neoplasias dessa região e equivalem ao terceiro tipo mais prevalente de tumor encontrado em cães machos (GOLDSCHMIDT; ZOLTOWSKI, 1981; ROSS et al., 1991; SHELLEY, 2002). Metástases podem ocorrer em pulmões, fígado, baço, linfonodos ilíacos e lombares.

Uma das principais características do desenvolvimento de neoplasias é o aparecimento de desequilíbrio entre os níveis de proliferação e apoptose celular no tecido alvo. Um evento que acompanha a replicação de DNA em tecido normal e em células transformadas é a presença no núcleo do antígeno nuclear das células em proliferação (PCNA), sendo usado

como marcador de proliferação. Para controlar uma população celular específica, ocorre a apoptose, em tecido normal e neoplásico e, atualmente, a avaliação da apoptose em tecido de modelos animais e humanos tem sido correlacionada com o potencial de crescimento dos cânceres (BURSCH et al., 1994; ISAACS, 1993; KONG; RINGER, 1996).

Numerosos relatos têm abordado o controle do crescimento tumoral pelas junções comunicantes do tipo GAP em muitos tecidos. Poucos dados, entretanto, sobre as glândulas perianais e suas neoplasias são encontrados na literatura, apesar de sua grande frequência entre os tumores caninos.

Pela inexistência de outros trabalhos envolvendo o estudo das principais conexinas expressas em glândula perianal normal, hiperplásica e neoplásica de cães e da taxa de proliferação celular e apoptose em glândula perianal normal, hiperplásica e neoplásica, consideramos este um trabalho pioneiro e relevante dentro da carcinogênese.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Conhecimento atual sobre as junções do tipo GAP e situação do tema de pesquisa.

2.1. JUNÇÕES COMUNICANTES TIPO GAP

2.1.1-Organização molecular das junções comunicantes do tipo GAP

As junções comunicantes do tipo GAP (JGAP) foram demonstradas fisiologicamente pela primeira vez em 1958, mas foram necessários 10 anos para se relacionar essas observações com as junções vistas na microscopia eletrônica. O termo “junção comunicante do tipo GAP” aplica-se a regiões especializadas onde as membranas plasmáticas de duas células adjacentes aproximam-se, sem se fundirem, delimitando um espaço intermembranas ou “gap” de 2- 3 nm, que separa duas células vizinhas. A observação por microscopia eletrônica mostrou que as JGAP apresentam uma estrutura pentalaminar característica, constituindo verdadeiras placas juncionais nessa região, um arranjo semicristalino altamente organizado (KOVAL, 2006) (figura 1).

Figura 1: Observam-se áreas mais distantes entre as células e a região intimamente em contacto em máxima aproximação

Makowski et al., (1977), com auxílio de métodos de cristalografia e de difração de raios-X, obteve imagens por difração óptica de frações de membranas ricas em JGAP e assim, propôs um modelo de organização da placa juncional, ainda atual, em que cada placa é composta por vários canais intercelulares. Os canais são formados pela associação, face a face

de estruturas hexaméricas de 7 nm de diâmetro (conexons) .Cada conexon é constituído por 6 subunidades protéicas transmembrânicas, as conexinas (Cx) e que oligomerizadas formam um poro central hidrofílico com cerca de 2 nm de diâmetro (MAKOWSKI et al, 1977; UNWIN; ZAMPIGHI,1980) (Figura 2 e 3).

Figura 2- Em (A) Eletrofotomicrografia após criofratura da placa juncional ,vê-se o lado interno da junção GAP. As proteínas assemelham-se a pequenos aros os quais refletem serem realmente canais. Estas proteínas são as moléculas de conexon. Em (B) temos a face P (face da fratura citoplasmática) em que se observa agregado de protuberâncias. Em (C), com microscópio eletrônico, observa-se a fina linha entre duas membranas plasmáticas, a junção GAP

O tamanho e o número de placas juncionais variam dependendo do tipo celular e do estado de atividade do tecido (BEYER, 1993).

Figura 3-Uma junção GAP **A.** neuritos de duas células conectadas por uma porção GAP. **B** Um aumento mostrando canais denominados conexons, cada um composto por seis subunidades protéicas denominadas conexinas, as quais unem citoplasma de duas células adjacentes e íons e pequenas moléculas podem passar em ambas as direções pelos canais

2.1.2. Conexinas: proteínas das junções tipo GAP

Os vários genes que codificam as diferentes conexinas, após 1986, foram clonados em mamíferos, frangos, sapo africano (*Xenopus*) e peixes. Para distinguí-las, foi necessário adotar uma nomenclatura específica. Dessa forma, a nomenclatura mais utilizada e aceita pela comunidade científica baseia-se no tamanho da proteína predita a partir da sequência do cDNA considerado, em KDa, precedida pelo termo genérico Cx (BEYER; PAUL; GOODENOUGH, 1987). As conexinas homólogas entre diferentes espécies são utilizadas usando no sufixo a abreviação da espécie. Como em alguns casos as conexinas identificadas apresentam massas moleculares muito próximas, emprega-se um número decimal como ocorre com a Cx 31 e Cx 31.1 (HENNEMANN et al., 1992).

Existe também uma nomenclatura alternativa que se baseia na análise filogenética das diferentes conexinas, ou seja, baseia-se nas homologias das sequências de nucleotídeos (KUMAR; GILULA, 1992). Os genes das conexinas originam-se de uma sequência primordial, ainda indeterminada, que poderiam ter sofrido ao menos uma duplicação no início ou imediatamente antes da evolução dos vertebrados, originando as subclasses α , β , (ou γ) (BENNETT et al., 1991). Por exemplo, a Cx32 aparece na classe β e foi a primeira Cx identificada nessa classe e, portando, sua nomenclatura seria β , 1 (Figura 4).

Existe, também, um consenso atual para adoção do termo Gj (GAP junction) seguido da classe (α , β , γ) e da ordem de descoberta em cada grupo quando se refere ao gene, nomenclatura não adota nesta tese.

Figura 4- Família multigênica das conexinas derivadas de um provável ancestral comum (MESNIL;YAMASAKI,1990).As conexinas são divididas em 3 subclasses de acordo com a estrutura do gene que as codificam

Todas as conexinas descobertas são codificadas por genes diferentes, localizados em cromossomos distintos. Na maioria das Cxs estudadas, a estrutura de seu gene é simples e conservada, com a particularidade de conter a sequência codificante em único exon (exon 2). Normalmente os genes de Cxs apresentam 2 exons separados por um intron de tamanho variável (3,5 a 11 kb). O primeiro exon, de pequeno tamanho (0,1 a 0,5 kb), corresponde a uma sequência 5' não traduzida (UTR) e o segundo exon à totalidade da sequência codificante por entre sequências 5' e 3' (UTR) (Figuras 5 a e 6).

Há algumas exceções com organizações mais complexas, entretanto, sobretudo no gene da Cx32 de camundongo (Figura 5b). Esse gene contém 4 exons; 3 exons de pequeno tamanho contendo sequências 5' UTR (exons 1, 1a e 1b) e um quarto exon (exon 2) contendo a sequência codificante (DUGA et al., 1999). No homem esse gene contém 3 exons (NEUHAUS et al., 1996).

Recentemente, algumas Cxs caracterizadas revelaram uma nova classe, γ , cujos genes têm estrutura diferente. Nessa classe o gene apresenta 2 exons sendo que a sequência codificante é partida em 2 exons e interrompida por sequência intrônica (CONDORELLI et al., 1998) (Figura 5c).

Figura 5- Estrutura do gene das conexinas. **A.** Estrutura comum dos genes das Cxs pertencentes à subclasse α , por ex, Cx43; **B.** Gene da Cx 32 de camundongo, subclasse β ; **C.** Gene das Cxs pertencentes à subclasse γ , por ex Cx35 arraia, Cx34. 7 perca

Figura 6- Identificações das 6 novas regiões Cx43 5'-UTRs em camundongos. Diagrama mostrando a organização genômica dos novos exons da Cx43, as combinações dos *splicing* alternativos encontrados. em vermelho está identificado o *splicing* que ocorre no pulmão ligando diretamente o éxon 1a ao éxon 2. (Adaptado de PFEIFER et al., 2004) P1, P2 e P3 promotores identificados que são “usados” de acordo com a disponibilidade de fatores de transcrição do tecido .L= large, s= small; ATG= start códon

2.1.3. Família de proteínas

As conexinas são proteínas transmembrânicas, não glicosiladas, com massas moleculares aparentemente variando de 21 a 70 Kda. Suas estruturas moleculares foram determinadas por técnicas bioquímicas realizadas a partir de frações subcelulares em junções ricas em junções do tipo GAP. A primeira conexina identificada foi a Cx 32 de fígado de rato e a partir de seu cDNA, usado como sonda, outras conexinas foram identificadas (BEYER et al., 1987; GOODENOUGH; STOECKENIUS, 1972; NICHOLSON et al., 1981).

Até o momento 21 conexinas foram identificadas em mamíferos. A análise das seqüências primárias das conexinas, deduzidas da seqüência de seus cDNA respectivos, revelou que embora diferentes, todas compartilham certo grau de homologia interespecie e interconexina. Assim, por exemplo, há 97,6% de homologia entre a Cx43r e a Cx43h e 95% entre Cx43m e Cx43r e quase 50% de homologia entre as seqüências de aminoácidos das Cx32 e Cx43 de rato (nas regiões conservadas interconexina) (Figura7).

Figura 7- **a)** Homologia das conexinas e estrutura. Filograma de 20 conexinas humanas calculadas usando ClustalW e omitindo o domínio C-terminal (HIGGINS; THOMPSON; GIBSON, 1996). Por homologia preoteica as conexinas formam 2 grandes subgrupos, α e β e um adicional grupo de conexinas com homologia intermediária.(SOHL; WILLECKE, 2003). Conexinas diferentes são diferenciadas pelo peso molecular baseando-se na sequência de aminoácidos. Entre parênteses a conexina do camundongo (c Cx) que difere da humana. **b)** Diagrama linear correspondente a Cx 43. Os dois domínios das alças extracelulares são interconectados por três pontes de dissulfeto. Regiões verdes apresentam alta homologia da sequência de aminoácidos dentro da toda a família protéica de conexina. Regiões em amarelo são homólogas dentro de um subgrupo de conexinas e cinza, regiões divergentes de conexina, variando os aminoácidos e o tamanho. Números correspondem às posições dos aminoácidos da conexina 43 e que define diferentes classes de domínios de conexinas homólogas

2.1.3.1 Organização estrutural das conexinas

Todas as conexinas compartilham uma topologia comum (Figura 8), demonstrado a partir das sequências de peptídeos de diferentes conexinas e por estudos de proteólise contra domínios extramembranares e combinados com imunomarcagem, usando anticorpos contra determinadas regiões das Cxs.

-4 domínios hidrofóbicos, conservados, representando cada um um segmento transmembrana; M1, M2, M3 e M4.

-2 alças extracelulares E1 e E2 com cerca de 20 -30 aminoácidos, contendo cada uma 3 resíduos de cisteína invariáveis em sequência conservada: CX6CX3C na alça 1 e CX4CX5C na alça 2. A exceção é a Cx31 onde a alça 2 é CX5CX5C (DUPONT et al., 1989; RAHMAN; EVANS, 1991). Estes resíduos de cisteína formam três pontes dissulfeto inter-hélice intramolecular (DAHL et al., 1992).

As extremidades aminoterminal (com cerca de 20 aminoácidos) e carboxiterminal e as hélices que unem M1 a M3 (com 40 a 60 aminoácidos) são citoplasmáticas.

Portanto, os segmentos transmembrânicos e a extremidade aminoterminal contêm seqüências muito conservadas e, as seqüências da hélice citoplasmática e extremidade carboxiterminal são variáveis em tamanho e seqüência de uma Cx à outra Cx. Estas regiões pouco conservadas constituem a “carta de identidade” de cada conexina (BEYER et al., 1987; PAUL, 1986). Por exemplo, na Cx26 r, a extremidade carboxiterminal tem 11 aminoácidos contra 60 aminoácidos da Cx32r. Estes domínios são os alvos de modificações pós-tradução de fato (fosforilação da extremidade carboxiterminal) ou potenciais (glicosilação da extremidade aminoterminal) (MUSIL; BEYER; GOODENOUGH, 1990 a; SAEZ et al., 1986).

Figura 8- Topologia membranar de uma molécula de conexina. As regiões: porção amino terminal, domínio transmembrana e alças extracelulares representam as porções mais conservadas entre diferentes conexinas. Cada alça extracelular contém três cisteínas (vermelho) conservadas em todas as Cxs. O domínio verde (M3) tem uma característica anfipática diretamente relacionada com movimento de fechamento da GAP. Os domínios citoplasmáticos correspondem às porções únicas em cada Cx e, portanto, específica (BEYER, 1993). **NH₂**(amina terminal); **COOH** (carboxila terminal); **I** (alça intracelular); **M** (Domínio transmembrana); **E** (alça extracelular)

2.1.4. Distribuição tecidual das conexinas

Com exceção das células musculares estriadas adultas, espermatozóides e das células circulantes do sangue, todos os outros tecidos expressam uma ou várias conexinas, em uma distribuição bastante complexa, complicando a determinação exata da função da comunicação intercelular de cada conexina expressa no tecido. Dados recentes sugerem que os canais juncionais possuem propriedades de permeabilidade diferentes de acordo com suas conexinas (Quadro1).

A Cx 43, por exemplo, é a mais amplamente distribuída e a Cx 22, 44 ou 31.1 a com menor expressão. Algumas Cxs são encontradas em combinações como, por exemplo, Cx37 e 40, co-expressas em níveis diferentes. Quando co-expressas podem ser encontradas na mesma placa juncional (Cx 26 e 32 nos hepatócitos) ou distintas (Cx43 e 32 nos epitélios foliculares da tireóide) (GUERRIER et al., 1995).

(Continua)

Conexinas	Distribuição tecidual
Cx26(2)	Fígado, pâncreas, determinados queratinócitos, células do epitélio intersticial, pinealócitos, cóclea interna, hipófise anterior, paratireóide, tireóide, rins, pulmão, baço, estômago, testículos, cérebro (células do sistema nervoso), glândula salivar
Cx30(6)	Pulmão, estômago, cérebro, útero, pele, cristalino
Cx30.3(5)	Blastócito, determinados queratinócitos (pele), rins
Cx31(1)	Determinados queratinócitos, blastócitos, células da trofoectoderma placentária, rins, testículos, olhos
Cx31.1(4)	Determinados queratinócitos, células do epitélio estratificado (pele), testículo
Cx32(1)	Hepatócitos, determinados neurônios, oligodendrócitos, células de Schwann, tireóide, rins, intestino, pulmão, baço, testículos, cérebro, glândula mamária, pâncreas, glândula salivar
Cx33(7)	Algumas células do testículo
Cx36(ou)	Retina, cérebro (neurônios)
Cx37(4)	Determinadas células endoteliais, determinados queratinócitos, células musculares cardíacas, testículos, ovários, neuroblastos corticais, rins, pulmão
Cx40(5)	Determinadas células endoteliais, células de blastócitos, células do sistema de condução cardíaca, ovários, células de Purkinje, pulmão, útero
Cx43(1)	Blastócitos, pele, córnea, fibroblastos, osteócitos, rins, glândula mamária células musculares cardíacas, células epiteliais do pulmão, determinados queratinócitos, hipófise anterior, paratireóide, pâncreas endócrino, supra-renais, tireóide, testículos, ovários, miométrio, músculos lisos, células endoteliais, cristalino, astrócitos, células epiteliais renais tubulares, macrófagos, células do tecido conjuntivo.
Cx44	Retina
Cx45(6)	Células musculares cardíacas, blastócitos, células epiteliais do pulmão, determinados queratinócitos, pele, coração, cérebro

(conclusão)

Conexina	Distribuição tecidual
Cx46(3)	Fibras do cristalino, células musculares cardíacas, células de Schwann, pneumócitos do tipo II
Cx50(8)	Fibras do cristalino, células epiteliais da córnea
Cx57(9)	Ovários, pele, coração, testículos, intestino, rins
Cx60	Ovários, colon, timo, baço

Quadro 1- Distribuição tecidual das conexinas (RNAm) de mamíferos

2.1.5. Regulação da expressão dos genes da conexina

Em mesmo tecido, a expressão dos genes que codificam para Cxs, pode ser modificada dependendo da situação, no curso do desenvolvimento, da condição fisiológica ou fisiopatológica particulares. Por exemplo, no útero, ocorre aumento da expressão de Cx43 no miométrio no momento do parto como resultado de hormônios ovarianos e estiramento mecânico das células para que haja sincronização das contrações para o nascimento. É uma regulação tecido - específica, porquanto o miocárdio que também expressa Cx43, não tem essa expressão aumentada (LANG et al., 1991; RISEK et al., 1990). Na glândula mamária, após o nascimento, há aumento da expressão da Cx26 nas células epiteliais do lúmen e da Cx43 nas células mioepiteliais para que haja uma contração uniforme das células para ejeção do leite (MONAGHAN et al.,1994). Dessa forma, observa-se que a expressão de uma mesma conexina pode ser diferentemente regulada segundo o tipo celular e que as expressões de diferentes conexinas podem ser reguladas diferentemente no mesmo tipo celular.

2.1.6. Canal juncional

2.1.6.1 Estrutura do canal juncional

O canal juncional é formado pela associação dos conexons de duas células vizinhas e, cada conexon, por sua vez, é formado pela oligomerização de conexinas. Dessa maneira, cada canal é composto pela associação de 12 moléculas de conexina ao redor de um poro central (UNGER et al., 1999) (Figura 9).

Figura 9- Organização molecular do canal juncional (a) Canal completo (b) a densidade foi obtida para mostrar o interior do canal. Limites da bicamada da membrana (M), GAP extracelular (E), e o espaço citoplasmático(C). As flechas brancas identificam as localizações de (c) as secções transversas estão paralelas à bicamada da membrana. O contorno vermelho em (c) estão a 1σ acima da densidade média. Estes contornos definem os limites da conexina. A forma aproximadamente circular destes contornos dentro da região hidrofóbica da bicamada é consistente com as 24 hélices do connexon

Figura 10- (a) - hélice vista de cima com seus domínios recentemente descritos e em (b) mostra os domínios M1 e M3 linearizando o poro central (FLEISHMAN et al., 2004). A =M2; B=M1, C=M3, D=M4

Fleishman et al.(2004), demonstraram experimentalmente as posições dos resíduos de aminoácidos presentes em cada - hélice das conexinas. Assim, os domínios M1 e M3 linearizam a face central do poro das junções GAP (figura 10). As - hélices M1 e M2 são mais sensíveis às mutações que M3 e M4 como encontrado em algumas síndromes (Charcot-Marie-Tooth e doenças de pele). Haveria desse modo uma maior compactação dessas hélices impedindo a passagem de moléculas essenciais de uma célula à outra.

A região de contacto entre dois connexons de duas células vizinhas, aparentemente, se faz por alças que constituem cada conexina. Segundo Foote et al. (1998), as alças E1 e E2 estariam organizadas em folhas antiparalelas produzindo interdigitações, ligeiramente inclinadas em relação ao plano perpendicular da membrana plasmática, formando um barril

(figura 11). Além disso, através da interação de dois conexons, estes estariam deslocados uns em relação aos outros em um ângulo de rotação de 30° ao redor do eixo central, o que contribuiria para um encaixe perfeito do canal juncional em relação ao meio extracelular (figura 10) (PERKINS; GOODENOUGH; SOSINSKY, 1998). Estas interações conexon a conexon interfeririam com numerosas ligações de hidrogênio, o que explicaria também a necessidade de condições drásticas para dissociar as membranas de células adjacentes ao nível da placa juncional.

Figura 11-Modelo de organização do barril (das alças extracelulares de Cxs pertencentes a dois conexons associados)

2.1.6.2 Montagem dos conexons

Nos últimos anos, foi demonstrado que diferentes conexinas podem participar de um mesmo canal juncional. Como um canal de JGAP individual é composto por 12 conexinas, células que expressam múltiplas conexinas podem produzir canais mistos o que indica que as conexinas podem se hetero-ologomerizar. A formação de canais por duas ou mais conexinas permitem as células produzir canais que têm uma única permeabilidade e características de aberturas e fechamentos (gating), também únicas, o que não ocorreria usando uma simples conexina (COTTRELL; BURT, 2005).

Dessa forma, diz-se que um conexon é homomérico se for composto por um único tipo de conexina e, heteromérico, se por conexinas diferentes. Os canais intercelulares podem também, por sua vez, serem constituídos por conexons homoméricos ou heteroméricos. Assim, canais formados por conexons homoméricos são chamados homotípicos e canais formados por conexons diferentes, de heterotípicos (figura 12).

Figura 12- Ilustração com as possibilidades de associação das conexinas em um connexon e dos connexons em um canal juncional (KUMAR ; GIGULA, 1996)

A existência de connexons heteroméricos foi observada *in vivo* e confirmada *in vitro*. Por exemplo, a Cx32/Cx26 no fígado (DIEZ; AHMAD; EVANS, 1999) e glândula mamária (BERTHOUD et al., 2000 a), Cx40/Cx43 no músculo liso (HE et al., 1999). A existência *in vivo* de canais heterotípicos formados por connexons heteroméricos não foi confirmado (YEAGER; UNGER; FALK, 1998).

Estudos funcionais a partir de células de mamíferos ou de oócitos de *Xenopus* transfectados com cDNA de diferentes Cx, formando canais heterotípicos, mostraram que estes têm propriedades diferentes em relação aos homotípicos, formados por connexons homoméricos (BEVANS et al., 1998; BRINK et al., 1997). Esses estudos também demonstraram a ocorrência de incompatibilidade entre tipos de connexons.

A montagem das conexinas parece ser regulada por sinais localizados na sequência peptídica das conexinas. As regiões do domínio carboxiterminal (C-terminal) e das alças E1 e E2 são importantes para a interação connexon/connexon (HAUBRICH et al., 1996). As regiões dos domínios aminoterminal, M1 e E1, parecem ter a função de interagir as conexinas no connexon (FALK et al., 1997).

A não funcionalidade de alguns canais heterotípicos, acredita-se, atualmente, estar relacionada ao funcionamento de alguns órgãos, estabelecendo barreiras na comunicação fisiológica entre grupos celulares (WEBER et al., 2004).

2.1.7. Dinâmica de formação e degradação das placas juncionais

Como a maioria das proteínas de membranas, as conexinas são sintetizadas pela via clássica de biossíntese de proteínas secretadas (PFEFFER; ROTHMAN, 1987).

As conexinas, assim, são sintetizadas no retículo endoplasmático (RE) por processo que necessita do reconhecimento e endereçamento das Cxs em direção à membrana reticular (FALK; GILULA, 1998). Ao contrário de muitas proteínas de membrana, as Cxs não necessitam do peptídeo de sinal. Na sua parte aminoterminal, possuem seqüências muito conservadas de resíduos não polares, separados por grupo de aminoácidos variáveis, que fazem essa função. Além disso, o primeiro segmento transmembrana M1, pode preencher essa lacuna no endereçamento da proteína para a membrana. Durante sua tradução, as cadeias polipeptídicas das Cxs em elongação adquirem sua estrutura secundária e são integradas co-transducionalmente na membrana do RE onde adotam sua topologia final (extremidades N- e C-terminal citoplasmáticas e alças extracelulares orientadas em direção à luz do RE). Nessa etapa é que as pontes dissulfeto são formadas (RAHMAN; CARLILE; EVANS, 1993). (Figura 13).

Figura 13- Modelo esquemático descrevendo o ciclo de vida da conexina. As Cxs biossintetizadas no RE incorporaria normalmente a via clássica de secreção e vesículas transportadoras de Cx sairiam do RE e se fundiriam com a rede CIS de Golgi. Sugere-se que populações de Cxs duplicadas, são translocadas das membranas do RE e provavelmente submetidas à degradação em proteossomos. Em algumas células transformadas as proteínas defeituosas podem alterar seu tráfico normal de secreção e incorporar-se em lisossomos para degradação. A oligomerização e formação de conexons foram sugeridas ocorrer no RE e na parte mais distal do aparelho de Golgi (RGT). Parece que os microtúbulos ajudam o transporte das vesículas com conexons à superfície celular. Os conexons aparentemente permanecem fechados colocando-se difusamente na membrana plasmática sendo que

moléculas de adesão (caderinas) ajudam a ancorar os conexons nos locais de contacto para a formação dos canais de JGAP. Sugere-se que proteínas liguem-se às conexinas, regulando a comunicação desses hemicanais e assim permitindo a passagem de pequenas moléculas como os mensageiros secundários. A placa da JGAP é reunida na borda externa com canais internos e propõe-se que eventualmente percam sua função internalizando-se como uma estrutura de dupla membrana chamada junção anular. Sugere-se que outros mecanismos de desmontagem e internalização por vias clássicas usando outras moléculas como clatrina e endossomas, mas esses mecanismos ainda estão entendidos plenamente e, portanto, não podem ser considerados regras gerais; e existem debates se as JGAP e conexinas internalizadas são degradadas em lisossomas ou proteossomas ou em ambos (LAIRD, 2005)

Segundo Koval (2006), as conexinas não seguem a via clássica de oligomerização das proteínas transmembrânicas ao formarem hexômeros. O local de oligomerização das Cxs em conexons não é exato, mas podem ocorrer em complexos múltiplos, à semelhança de muitas outras proteínas que também formam canais, antes de alcançarem a membrana plasmática. Entretanto, dois sítios potenciais foram descritos: Musil e Goodenough (1993), mostraram que a oligomerização ocorreria numa região distal do trans-Golgi para determinada conexina sendo que na maioria das Cxs a montagem seria numa região especializada do RE, os CIERG (compartimentos intermediários entre o RE e o Golgi) (GEORGE; KENDALL; EVANS, 1999) (figura 14).

Figura 14- Vias de oligomerização da conexina. As conexinas são co-tranlacionalmente inseridas na membrana do RE (retículo endoplasmático). Dependendo do subtipo de Cx a oligomerização pode ocorrer no CIERG (compartimento intermediário entre o RE e o Golgi) (Cx32 em verde) ou na rede trans do Golgi (RGT) (Cx43 em verde). O potencial de oligomerização no RE leva a altos níveis de expressão de conexina e isto também é mostrado para Cx 32. Após a formação dos hemicanais eles são transportados à membrana plasmática, podendo funcionar como canais (que permitem a passagem de moléculas de sinalização) ou emparelham-se com hemicanais da célula adjacente formando um canal intercelular completo. Na membrana plasmática os canais podem reunir-se numa placa semi cristalina, as placas da junção GAP, que contem de 10 à milhares de canais (KOVAL, 2006)

Como os conexons alcançam à membrana plasmática e como se reagrupam para a formação da placa juncional não está claro. Parece que os conexons são inseridos na membrana plasmática onde permanecem como hemicanais e reencontram ao acaso os conexons da célula vizinha e se deslocam sob a forma de canal já pronto até o local juncional por meio de movimentos laterais na bicamada lipídica (FALK; GILULA, 1998, QUIST et al., 2000). Moléculas de adesão, como a caderina E, facilitam a interação de hemicanais de têm uma meia vida entre 1 a 5 horas, dependendo da conexina e do tipo celular considerado. células adjacentes (FUJIMOTO et al., 1997).

As conexinas Para a maioria das conexinas essa meia vida é curta se considerarmos as junções oclusivas e os desmossomos, os quais têm uma meia vida de 24 horas (DARROW et al., 1995; MUSIL; BEYER; GOODENOUGH, 1990a). A Cx 46, entretanto, apresenta a maior meia vida, 24 horas ou mais (JIANG; PAUL; GOODENOUGH, 1993). Segundo Falk (2000), as conexinas formam estruturas em permanente movimento, dividindo-se e se fundindo constantemente.

As junções anulares (figura 13) são vesículas ricas em conexinas no citoplasma de células ou tecidos que super expressam conexina, apresentando uma estrutura pentalaminar semelhante às JGAP (LARSEN et al., 1979; NAUS et al., 1993) e são estruturas oriundas da internalização de parte ou totalidade de uma placa juncional, por uma das células em contacto, pela intensa interação conexon-conexon no espaço intercelular, que os impede de se dissociarem e forçando-os a se internalizarem sob a forma de um canal completo (GHOSHROY; GOODENOUGH; SOSINSKY, 1995).

Os mecanismos de desintegração das JGAP ainda não foram totalmente desvendados, mas a degradação envolve lisossomas e proteossomas (LAING et al., 1995), sendo que as conexinas replicadas ou oligomerizadas incorretamente são seletivamente levadas aos proteossomos e endossomas (Figura 15) onde são degradadas (VANSLYKE et al., 2000; LAIRD, 2005).

Figura 15- Fosforilação da Cx 43 dependente de p34^{cdc2} cinase correlaciona a internalização da JGAP com o início da mitose. **1:** neste modelo, Laird (2005) propôs que a proteína solúvel p34^{cdc2} é diretamente recrutada à membrana plasmática no início da fase M(mitose) onde a Cx 43 é fosforilada em nova isoforma, porquanto se notou que uma fosforilação indireta da Cx 43 dependente de p34^{cdc2} cinase pode ocorrer; **2:** Com a fosforilação da Cx 43 os canais das JGAP fecham-se; **3:** as JGAP conseqüentemente internalizam-se como junções anulares e por vias indeterminadas alcançam lisossomos e proteossomos onde são degradadas

2.2. COMUNICAÇÃO INTERCELULAR VIA JUNÇÕES DO TIPO GAP

2.2.1. Propriedades dos canais juncionais

2.2.1.1. Definição da permeabilidade juncional

As Cxs são organizadas ao redor de um poro hidrofílico, de 10 a 20 Å de diâmetro (figura 3), o qual permite a troca direta entre citoplasmas de células vizinhas de moléculas hidrofílicas com diâmetro inferior a 1000 Da (SCHWARZMANN et al., 1981), por ex, moléculas biologicamente ativas como íons (K⁺, Cl⁻...), mensageiros secundários como AMPc, IP₃, Ca⁺⁺, nucleotídeos (ADP, ATP, CTP) e alguns compostos do metabolismo

intermediário (aminoácidos...). Moléculas maiores, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, não passam pelo canal (CHARLES et al., 1992; SAEZ et al., 1989).

Após os anos 70, muitos trabalhos mostraram por meio de medida de transferência de sondas fluorescentes de propriedades variáveis que a permeabilidade depende do tamanho, da forma e carga das moléculas trocadas (KANNO; LOEWENSTEIN, 1966; NICHOLSON et al., 2000). Quanto à permeabilidade das moléculas biológicas poucos estudos foram realizados.

2.2.1.2 Modulação da montagem dos canais intercelulares

Mecanismos, relacionados ou não com a variação do conteúdo intracelular de Cx, regulam em diferentes níveis a comunicação intercelular tipo GAP. Nas células da maioria dos tecidos, a montagem dos canais tipo GAP é modulada por fatores extrínsecos e intrínsecos que alteram os níveis de transcrição dos genes para Cx ou sua degradação, um processo que leva horas. Mas essa montagem pode ocorrer rapidamente por mecanismos que induzem a abertura ou fechamento dos canais. Chamamos de gating a transição de conformação entre a abertura e o fechamento dos canais juncionais. Zampighi e Unwin (1979) propuseram um modelo no qual a transição de uma configuração à outra seria por torção dos hexâmeros, no sentido dos ponteiros de um relógio e o movimento seria por deslizamento de monômeros um em relação aos outros (UNWIN; ZAMPIGHI, 1980). Unwin (1989) completou esse modelo levando em conta a topologia e composição dos aminoácidos das Cxs, e, assim, quando do fechamento dos canais, a inclinação do segmento M3 retiraria os grupamentos polares da luz do canal e os substituiria por grandes resíduos de fenilalanina. Estes, então, obstruiriam a luz do canal por preenchimento etéreo (figura 16).

A regulação de abertura e fechamento dos canais ocorre em segundos, em respostas às modificações do ambiente intracelular como pH ou concentração de Ca^{++} (LIU et al., 1993) ou influência de diferentes proteínas cinase (BENNETT et al., 1991; SAEZ et al., 1997).

Segundo Lampe e Lau (2004), as conexinas são modificadas pós translacionalmente pela fosforilação e, assim, a fosforilação tem sido relacionada com a regulação da comunicação pelas JGAP nos vários estágios do ciclo de vida da conexina como tráfego, associação e dissociação, degradação bem como no bloqueio dos canais JGAP (LAIRD, 2005).

Embora a conclusão da sequência do genoma humana tenha aumentado o número de conexinas humanas de uma dúzia para aproximadamente 20, temos poucas informações experimentais diretas destas recém descobertas conexinas. Muitas conexinas não somente têm sequências consensuais de fosforilação da proteína cinase mas, também, tem sido demonstrado serem fosforiladas por cinases *in vitro* e em muitos casos em cultura celular ou de tecidos. Além disso, conexinas como Cx31, Cx32, Cx 37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx 50 e Cx 56 demonstraram-se serem fosfoproteínas (LAMPE; LAU, 2000a; SAEZ et al., 1998). Dados funcionais têm sido relatados para Cx 32, Cx 43, Cx45 e Cx 56: a região terminal C parecer ser a primeira região a ser fosforilada. Entretanto a Cx 56 pode ser também fosforilada na região da alça citoplasmática (BERTHOUD et al., 1997), enquanto a Cx 43 não contém resíduo serina na região da alça e, portanto, não é fosforilada nessa região. A região N terminal parece não ser fosforilada.

A Cx 26 é a única conexina que não sofre fosforilação (TRAUB et al., 1989) por ser a menor conexina com poucos aminoácidos na região C terminal após o quarto domínio transmembrana, o qual pode interagir com elementos de sinalização citoplasmáticos. Como as Cx 26 podem formar canais funcionais, acredita-se que a fosforilação das conexinas não é necessária para a formação das JGAP. À semelhança da Cx 26, as Cxs 43 mutantes que perderam a maior parte da porção C-terminal citoplasmática, também podem formar canais funcionais, mas, entretanto, exibem permeabilidade e propriedades eletroforéticas da Cx 43 selvagem (FISHMAN et al., 1991).

B

Figura 16- Modelos propostos de abertura e fechamento dos canais, baseando-se em análise de imagem de microfotografias eletrônicas de tecidos rapidamente congelados. **A)** UNWIN et al., 1980: neste modelo a alteração na conformação aberta para fechada dos canais é efetuada por rotação dos hexâmeros no sentido dos ponteiros de um relógio, provocando assim um deslizamento dos monômeros uns sobre os outros levando o fechamento dos poros. **B)** UNWIN, 1989 :A inclinação do segmento M3 retira os grupamentos polares da luz do poro ao mesmo tempo em que grupamentos fenilalanina obstruem o poro

2.3. IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS DAS JUNÇÕES TIPO GAP

De modo geral, as JGAP permitem a harmonização e a sincronização das atividades celulares por troca de íons (nas, por ex, células excitáveis como neurônios e cardiomiócitos). Também têm função importante de regulação da homeostasia tecidual por manter as constantes fisiológicas como pH e concentrações iônicas em uma dada população celular (LOEWENSTEIN; KANO, 1966).

Dessa maneira, as JGAP dão suporte às trocas metabólicas que ocorrem entre as células e, admite-se, participarem, por exemplo, da nutrição de órgãos pouco vascularizados como o cristalino (GOODENOUGH; DICK; LYONS, 1980), pela passagem de pequenos metabólitos (aminoácidos, nucleotídeos) ou ao contrário, como no fígado, ao permitirem a diluição de compostos tóxicos entre a maior parte dos hepatócitos.

As JGAP também podem participar da correção de defeitos somáticos das células, como da ocorrência de mutação que inativa o gene da hipoxantina-guanina-fosforibosil-

transferase (enzima da via de biossíntese das purinas). Essas células adquirem um fenótipo normal quando co-cultivadas com células iguais sem a mutação pela transferência do nucleotídeo que falta ou um de seus derivados, via JGAP, da célula normal para a mutante (PITTS; SIMMS, 1977). Além disso, podem amplificar as respostas biológicas das células por um fator de sinalização. Por exemplo, se uma célula não foi diretamente ativada pela fixação de um hormônio ao seu receptor, pode ser ativada pela célula adjacente ativada via JGAP por transferência de mensageiros secundários como AMPc, IP3, Ca^{++} (MUNARI- SILEM et al., 1995).

Outro papel importante das JGAP é durante a embriogênese. Na maioria dos organismos a comunicação intercelular via JGAP é observada em estágio bem precoce. No camundongo, as JGAP estão presentes após a blástula (8 células) onde 6 genes de Cx já são transcritos (DAVIES et al., 1996). A JGAP permite a passagem de sinais envolvidos no estabelecimento de gradientes morfogênicos (GREEN, 1988; PAUL et al., 1995), mas restritas a determinadas regiões. Essa criação de “territórios de comunicação” é mediada em parte pela expressão diferencial e espaço temporal de diferentes genes de Cx e, em parte, pela impossibilidade de determinadas conexinas formarem canais heterotípicos (LO, 1996).

A conexina está também implicada no controle de proliferação, diferenciação e apoptose celular.

Deficiência ou função imprópria das JGAP recentemente foram associadas a uma variedade de doenças, incluindo algumas formas de neuropatias, surdez hereditária, catarata, doenças de pele, cardiopatias e câncer (SOLAN; LAMPE, 2005).

2.3.1. JGAP e carcinogênese

2.3.1.1 Conexina e progressão do câncer

Um fato importante a se considerar é se a diminuição das JGAP e/ou expressão das conexinas acompanha a progressão do câncer. Existindo uma relação pode ser que as conexinas estejam envolvidas no processo de carcinogênese e a perda progressiva das JGAP favoreça a progressão tumoral.

2.3.1.2 Perda precoce da conexina na progressão tumoral

Se a diminuição da Cx é responsável pela carcinogênese é muito difícil determinar em qual momento do processo de múltiplos estágios realmente ocorre. Têm-se sugerido que os tumores possam derivar da expansão clonal de uma célula tronco que ou não expressa a conexina ou está muito diferenciada para expressá-la (MESNIL et al., 2005) .

A primeira hipótese pode explicar porque as células não se comunicam em estágios precoces da tumorigênese e a segunda situação pode explicar porque células cancerosas expressam Cx nos estágios precoces, mas, aos poucos, vão diminuindo o nível de expressão ou função da conexina pelo início das ativações oncogênicas nos estágios mais tardios da progressão tumoral (TOSKO, 2003).

Em muitos casos a diminuição da Cx parece ser um evento precoce, podendo ocorrer nas displasias de células de lesões pré-cancerosas sendo que se hipotetizou contribuir para sua progressão tumoral.

Por exemplo, a Cx 43 está altamente reduzida nas regiões displásicas do cérvix humano comparado ao tecido normal (KING et al., 2000). Estes e outros exemplos da literatura apóiam em favor de haver um evento precoce favorecendo a expansão clonal de células anormais (COCHAND-PRIOLET et al., 1998).

Estas observações da diminuição da expressão de Cx ou perda das JGAP nos estágios precoces da tumorigênese não podem ser consideradas como lei geral. Na maioria dos casos a situação é mais complicada e depende do tecido considerado.

Por exemplo, na próstata ocorre nos estágios mais tardios a diminuição da expressão da Cx 43, mas nunca nos benignos, sugerindo que a diminuição da expressão de Cx 43 não está envolvida na iniciação do câncer prostático (TSAI et al., 1996). Esta hipótese é reforçada pelo fato que há um acentuado aumento na incidência e intensidade da Cx 43 na imunoistoquímica nos casos de hiperplasia prostática (HABERMANN et al., 2001, 2002).

A proliferação celular é um processo estritamente regulado e controlado em todos os órgãos na ausência de alterações patológicas. As células têm sua capacidade de proliferar diretamente relacionada à sua capacidade de se diferenciar ou de expressar marcadores de diferenciação. Por exemplo, a pele tem a capacidade de se renovar devido a sua capacidade de proliferar a partir de células tronco e, aos poucos, as células vão perdendo essa capacidade proliferativa, conforme se diferenciam. Nas células cancerosas, este equilíbrio entre proliferação e diferenciação é perdido.

O processo de carcinogênese, ou seja, de formação de câncer, em geral se dá lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor visível. Esse processo passa por vários estágios antes de chegar ao tumor. São eles:

Estágio de iniciação: É o primeiro estágio da carcinogênese. Nele as células sofrem o efeito dos *agentes cancerígenos ou carcinógenos* que provocam modificações em alguns de seus genes. Nesta fase as células se encontram geneticamente alteradas, porém, ainda, não é possível se detectar um tumor clinicamente. Encontram-se "preparadas", ou seja, "iniciadas" para a ação de um segundo grupo de agentes que atuará no próximo estágio.

Estágio de promoção: É o segundo estágio da carcinogênese. Nele, as células geneticamente alteradas, ou seja, "iniciadas", sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação é necessário um longo e contínuo contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato com agentes promotores muitas vezes interrompe o processo nesse estágio. Alguns componentes da alimentação e a exposição excessiva e prolongada a hormônios são exemplos de fatores que promovem a transformação de células iniciadas em malignas.

Estágio de progressão: É o terceiro e último estágio e se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nesse estágio o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença. Os fatores que promovem a iniciação ou progressão da carcinogênese são chamados agentes oncoaceleradores ou carcinógenos.

Os genes modificados, freqüentemente encontrados em cânceres humanos, estão relacionados com a proliferação celular, como o p53 e o ras. Além desses genes reguladores do ciclo celular existe um segundo grupo de genes controladores da proliferação celular que intervêm na harmonização do comportamento proliferativo de uma célula com suas homólogas adjacentes. São genes relacionados com os processos de reconhecimento e de comunicação intercelular como as moléculas de adesão ou como as conexinas.

Em 1966, Loewestein e Kano observaram que as células cancerosas apresentavam uma diminuição na sua capacidade de comunicação intercelular em relação às células normais e, portanto, as JGAP deveriam estar envolvidas na carcinogênese. A comunicação intercelular entre células homólogas (células tumorais) e células heterólogas (entre tumorais e normais), realmente, estava diminuída ou bloqueada. A restituição dessa capacidade de comunicação revertia o fenótipo canceroso em determinadas linhagens de células tumorais (KRUTOVSKIKH; OYAMADA; YAMASAKI, 1991; YAMASAKI, 1990, 1991). Sabe-se, atualmente, que a diminuição das JGAP em células tumorais deve-se a perda de expressão de conexinas ou à sua localização aberrante (KRUTOVSKIKH et al., 1994; LEE et al., 1992). Desse modo, a presença das JGAP protege as células de um desenvolvimento anárquico.

A maioria dos estudos, até hoje, não encontrou mutações na expressão das conexinas em tecidos cancerosos, com exceção de uma mutação no gene da Cx 32 em linhagens de células com hepatocarcinoma em rato, quimicamente induzido, o que leva a localização aberrante da Cx (YAMASAKI et al., 1995). Mutações silenciosas no gene 43 em linhagens de rato e gene 43 em câncer de colon (DUBINA et al., 2002) foram observadas.

Devida a ausência de mutações nos genes da conexina nos cânceres, os genes da conexina foram classificados como **genes supressores de tumores do tipo II** após estudos de hibridização subtrativa em células de carcinoma mamário (LEE; TOMASETTO; SAGER 1991).

Na maioria das neoplasias malignas, a localização das conexinas pode ser aberrante. Recentemente, Nishimura et al. (2003), demonstraram que as células tumorais com conexina aberrantemente localizadas estavam diretamente ligadas à expressão de caderina E (caderina E é uma molécula de adesão, dependente de Ca^{++} , que associada à β e catenina, constituem o principal componente das junções aderentes em vertebrados, restabelecendo o contacto físico de célula a célula) (NEI et al., 1999).

2.3.2. Função das conexinas no controle da proliferação, diferenciação e apoptose celular

Figura 17- Sob a influência de agente patogênico, por exemplo, um tóxico químico, a célula tentará manter a homeostasia celular por: comunicação extracelular em que uma célula distal pode atuar sobre a outra por meio de fatores de crescimento; comunicação intracelular feita por meio de reguladores translacionais, transcripcionais e pós-translacionais e por meio de sinal intercelular via JGAP, a célula atua na sua adjacente. O ponto final biológico seria a senescência ou proliferação ou diferenciação ou apoptose celular ou uma resposta adaptativa das células diferenciadas (UPHAM; WEIS; TROSKO, 1998)

Existem inúmeros estudos sobre a atuação das conexinas (figura 17), portanto das junções GAP, sobre a proliferação celular *in vitro* e na tumorigenicidade *in vivo*, bem como sobre a diferenciação e apoptose celular.

Por exemplo durante a regeneração hepática após hepatectomia parcial ou lesão aguda por tóxicos, a expressão das JGAP está temporariamente diminuída até haver a reconstituição do órgão. Esses estudos de regeneração do fígado após hepatectomia, onde a síntese de iniciação sincrônica de DNA era precedida por diminuição da expressão de Cx, sugerem que a diminuição das JGAP pode estar envolvida no sinal inicial para a proliferação celular (KOJIMA et al., 1994 a, 1994 b). Entretanto, Neveu et al. (1990) e TEMME et al.(2000), demonstraram que hepatócitos completamente desprovidos de comunicação via JGAP eram capazes de entrar no ciclo celular sobre estimulação mitógena. Estudos recentes têm sugerido que baixa expressão de JGAP durante a mitose possa servir para separar o pool celular de sinais moleculares (FLADMARK et al., 1997) e, portanto, assegurar que durante os estágios críticos de divisão celular as células em proliferação fiquem isoladas de sinais danosos mediados pelas células vizinhas.

Pouco se sabe como as JGAP regulam a proliferação celular, mas trabalhos recentes têm sugerido que a Cx pode regular a proliferação celular independentemente da comunicação celular, atuando sobre a expressão de genes celulares envolvidos com o ciclo celular (ZHANG et al., 2001; DUFLOT-DANCER et al., 1997; MOORBY; PATEL, 2001). Os efeitos para determinada conexina não são necessariamente reproduzidos em todos os tipos celulares (RAE et al., 1998; OMORI; YAMASAKI, 1999) e conexinas diferentes atuam diferentemente sobre a proliferação celular sobre o mesmo tipo celular (MESNIL et al., 1995).

O impacto da expressão de conexina é diferentemente reproduzido em células de cultura ou *in vivo* nos tumores (EGHBALI et al., 1990, 1991) e essa diferença pode estar relacionada à quantidade de expressão de Cx expressa pelo fenótipo alterado (KIANG et al., 2000). Mas, a função supressora de tumor das Cxs pode estar sendo potencializada *in situ* em relação à *in vitro* ou a expressão da Cxs pode estar atuando em outros níveis ou mecanismos diferentes de forma a reverter o fenótipo maligno de linhagens celulares tumorais. Acompanhando a diminuição da velocidade de proliferação celular, a expressão de Cx para determinadas linhagens celulares pode induzir a reexpressão de caracteres de diferenciação (PROULX; LIN; NAUS, 1997; VOZZI et al., 1995; MEHTA et al., 1999). Igualmente ao que ocorre para o controle da proliferação celular nem todas as Cxs exercem o mesmo efeito sobre o nível de expressão de caracteres de diferenciação (HELLMANN et al., 1999).

Como partes da mitose e a apoptose têm características comuns regulatórias (KASTEN; GIORDANO, 1998), não é surpresa que as JGAP participem de ambos os processos.

Wilson; Close e Trosko (2000) relataram níveis altos de JGAP durante os estágios iniciais da apoptose e da mitose e, em seguida, uma diminuição conforme os processos prosseguem. Durante ambos os processos, a ativação das vias de sinalização de transdução de sinais envolvendo Cdc2/Ciclina B cinase é um evento importante (KING; CIDLOWSKI, 1995) assim como a fosforilação da Cx43 *in vitro* dependente da Cdc2 cinase (LAMPE ; al., 1998). Mas a dúvida se a fosforilação da Cx 43 influencia a apoptose e mitose ou se a iniciação dessas vias resulta na fosforilação da Cx e inibição das JGAP, continua.

Como muitos promotores tumorais e oncogenes sabidamente inibem as JGAP e apoptose, e, muitos promotores antitumorais aumentam as JGAP e apoptose (TROSKO; GOODMAN, 1994), hipotetizou-se que o sinal de morte possa ser mediado via JGAP. A habilidade de carcinógenos não genotóxicos como ésteres de forbol de romperem as JGAP e ao mesmo tempo induzir a apoptose, sugere que existe uma forte ligação entre as JGAP e a

apoptose. Entretanto, isso não é regra geral e existem trabalhos (KOLAJA; PETRICK; KLAASSEN, 2000 b) em que a apoptose pode ocorrer na ausência de JGAP funcionais, além do fato que com certos outros carcinógenos exista a correlação entre a diminuição das funções JGAP, mutagênese elevada e redução da apoptose (KOLAJA; ENGELKEN; KLAASSEN, 2000 a). Assim, parece que uma JGAP funcional é necessária nos estágios iniciais da carcinogênese mas essa comunicação é perdida nos estágios mais avançados.

Portanto, tanto na supressão de proliferação como na sinalização para a apoptose, as JGAP servem para manter uma média ótima entre proliferação e morte celular. O rompimento das JGAP *per se* não altera as taxas de proliferação e apoptose, mas exige um estímulo adicional (TROSKO; RUCH, 1998) e esse estímulo pode advir da ativação de um oncogene celular ou inativação de um supressor de tumor nas células iniciadas ou pré-neoplásicas (WATANABE; TONOSAKI, 1995).

4. A SITUAÇÃO DO ASSUNTO DE PESQUISA

2.4.1. Anatomia e histologia da região perineal em cães

O períneo é a região de saída pélvica, limitada dorsalmente pela cauda, ventralmente pelo escroto no cão macho (ou na fêmea pela comissura dorsal da vulva) e pela pele que cobre os músculos obturador interno e glúteo superficial pareado e a tuberosidade do ísquio lateral. Profundamente, o períneo é limitado: acima pela 3ª vértebra caudal, lateralmente pelo ligamento sacrotuberoso e logo abaixo pelo arco isquiático. O sistema urogenital em ambos os sexos continua na região perineal para ocupar a região pudenda (EVANS; HOWARD; SUSAN, 1993).

A fossa isquiorretal forma uma depressão profunda, limitada pelos músculos coccígeo e elevador do ânus, lateralmente à porção pélvica terminal do trato digestório e aparelho urogenital.

Na porção mais caudal da região perineal (Figura 18) encontra-se, dorsalmente, os músculos esfínter anais externos, que demarcam o limite caudal do reto e, ventralmente, o músculo constritor vulvar da fêmea ou o músculo retrator do pênis no macho. Seu limite ventral e lateral inferior é formado pelo músculo obturador interno e, o bordo dorsal e lateral superior, pelo músculo glúteo superficial (EVANS, HOWARD; SUSAN, 1993).

Figura 18-Anatomia perineal normal (baseado em EVANS, HOWARD; SUSAN, 1993).

A fáscia perineal, somatória de fáscias que convergem para o ânus, pode ser dividida em superficial e profunda. A superficial serve como um leito para a acomodação da gordura da fossa isquiorretal pois possui uma grande quantidade de pequenos vasos e nervos. A profunda cobre a superfície dorsomedial do músculo obturador interno e está firmemente aderida à porção subcutânea da tuberosidade isquiática ventral e à porção adjacente que corre obliquamente ao ligamento sacrotuberoso, caudolateralmente. No macho, a fáscia perineal profunda se encontra aderida aos músculos isquiocavernosos direito e esquerdo (EVANS; HOWARD; SUSAN, 1993).

De acordo com Gourley e Gregory (1992), o segmento terminal do trato digestório é o canal anal, o qual se estende de 01 a 02 cm do reto e ânus. Associados ao ânus estão as glândulas anais e seus sacos e as glândulas perianais.

Três zonas compreendem a área anorretal canina: colunar, intermediária e cutânea. A zona colunar é a mais interna, a qual é contígua com o reto terminal. Esta zona possui uma série de sulcos longitudinais em submucosa e mucosa denominada colunas ou papilas anais. As bolsas entre estas colunas são chamadas seios anais. Altura e profundidade destas colunas e seios anais variam conforme o indivíduo e raça. Cães da raça Pastor Alemão e Setters possuem uma maior quantidade de colunas e seios anais, e, talvez, por esta razão, apresentem maior predisposição à fistulas nessa região. A extensão da zona colunar pode variar de 03 a 25 mm. Seios anais estendem-se caudalmente e terminam em fundos cegos abaixo da linha anocutânea (criptas anais). A zona intermediária é a porção mais estreita do ânus e, geralmente, mede menos de 10 mm de largura. A junção da mucosa e da zona intermediária é chamada de linha anocutânea. A zona mais externa do ânus é a zona cutânea que se apresenta como pele relativamente glabra. Esta zona contém a maioria das aberturas das glândulas da região anal (GOURLEY; GREGORY, 1992).

De acordo com Gourley e Gregory (1992), a região perianal apresenta músculos de grande importância: músculo esfíncter anal externo, responsável pela continência fecal; músculo esfíncter anal interno, os quais juntamente com outros músculos da defecação, controlam a defecação indiscriminada; músculo coccígeo; músculo coccigeoanal. A inervação se faz por ramos do nervo pudendo. O suprimento sanguíneo é proveniente das artérias perineais.

Nesta região, três tipos glandulares se fazem importantes: glândulas perianais, anais e dos sacos anais.

Glândulas perianais estão localizadas ao redor do ânus na zona anocutânea, e podem alcançar um raio de 04 cm e uma espessura de 08 mm. Estruturas e elementos de glândulas

perianais também são encontrados em paredes de ductos de saco anal e podem se estender periféricamente em regiões ricas em folículos pilosos.

Devido ao fato das glândulas perianais estarem presentes quando do nascimento, (CASTAGNARO; NEGRO; VALENZA, 1990; HAYES; WILSON, 1977) e continuarem a crescer durante a vida de um cão macho inteiro, adenomas nestas regiões são comuns em animais adultos (EVANS; HOWARD; SUSAN, 1993).

Como relatam em seu trabalho, Goldschmidt e Zoltowski (1981), devido à semelhança destas células com hepatócitos, as glândulas também são conhecidas como hepatóides ou glândulas hepatóides circunanaís.

As glândulas anais são glândulas tubuloalveolares, as quais se abrem para o meio externo na zona intermediária do canal anal. Microscopicamente, elas estão localizadas lateralmente e cranialmente às glândulas perianais e sua secreção, no cão, apresenta aspecto gorduroso.

As glândulas do saco anal localizam-se na parede do saco e se abrem dentro dele. O saco anal, conseqüentemente, é um reservatório para as secreções das glândulas de sua parede e a secreção pode ser serosa à pastosa e de odor não muito agradável. Ambos os sacos anais e seus ductos são revestidos por epitélio escamoso, estratificado, cornificado, o qual se situa sobre uma espessa capa de tecido glandular misturado a tecido conjuntivo e linfático difuso (EVANS; HOWARD; SUSAN, 1993).

Os sacos anais estão situados entre os músculos esfíncter anal externo e esfíncter anal interno e cada saco se comunica com a superfície da pele por um ducto individual (GOLDSCHMIDT; ZOLTOWSKI, 1981), localizado em cada lado do ânus (SHELLEY, 2002).

As glândulas perianais (circunanaís ou hepatóides) foram descritas pela primeira vez em 1923 (NIELSEN; ATTOSMIS, 1964; SHABADASH; ZELIKINA, 1995, 2002) (Figura 19). Estudos ultraestruturais e imunoistoquímicos demonstraram que as células das glândulas perianais apresentam retículo endotelial bem desenvolvido e inúmeros corpos multivesiculares no seu lúmen. Essas glândulas apresentam dimorfismo sexual, sendo que nas fêmeas adultas sobrevém uma acentuada e significativa regressão com características estruturais que sugerem uma degeneração por formarem ilhas isoladas de células. Nos machos formam camadas glandulares sólidas entre as camadas da pele, suplantando em número todos os outros tipos glandulares. Nos filhotes (1 a 38 dias), de ambos os sexos, não existem diferenças evidentes e, posteriormente, rapidamente se desenvolvendo às glândulas dos machos adultos. Nos filhotes fêmeas o desenvolvimento é ainda mais rápido e, com 38 dias, o

tamanho absoluto das glândulas é três vezes o das fêmeas adultas (SHABADASH; ZELIKINA, 1995) .

Figura 19- Observam-se vários lóbulos das glândulas perianais com as células de reserva (basais) e as células diferenciadas em meio ao estroma

As glândulas perianais, apesar de estarem presentes nos canidae e bovidae, não estão nos felidae (HOLT, 1985; SHABADASH; ZELIKINA, 2002). Entre os mamíferos silvestres, os macacos são os únicos representantes além de alguns roedores (ESPLIN; WILSON; HULLINGER, 2003; HOLT, 1985; UMPHLET et al., 1988). Sua função ainda não está bem estabelecida, porém, sugere-se a possibilidade de produção endócrina ou secreção de ferormônios (UMPHLET et al., 1988) e, ainda de acordo com Shabadash e Zelikina (1995), as células das glândulas perianais ou hepatóides (Figura 19), são exócrinas e suas células secretam uma proteína para canais intercelulares e destes aos ductos e canais pilosos. Rodeando cada lóbulo vêem-se as células basais, indiferenciadas e achatadas e células diferenciadas, poligonais, que se comunicam por desmossomos, interdigitações e junções GAP.

Podem ser consideradas glândulas de odor, sendo que suas proteínas cobrem a superfície da região perineal, sendo preservadas nas fezes como um marcador olfatório.

2.4.2. Adenomas e carcinomas de glândula perianal

Histologicamente os carcinomas perianais se distinguem por apresentarem a maioria de suas células pobremente diferenciadas, com núcleo basofílico e citoplasma escasso. Figuras de mitose e invasão vascular são freqüentemente visualizadas (OWEN et al., 1975). As células tumorais têm aparência cubóide a colunar, ovóide, vesículas nucleares e nucléolo único. Os tumores (Figura 20 e 21) são usualmente circunscritos com cápsula pouco espessa, formando massas esféricas de tamanho variado. A superfície de corte geralmente é alaranjada com textura oleosa.

Figura 20- Neoplasias de glândulas perianais

Apresentam, muitas vezes, áreas hemorrágicas e ulceradas (GOLDSCHMIDT; ZOLTOWSKI, 1981).

Figura 21- Adenocarcinoma e adenoma tipo I de glândulas perianais.

2.4.3. Incidência, Etiologia e Fatores de risco

Os tumores das glândulas perineais são comuns no cão e emergem mais freqüentemente das glândulas perianais (glândulas sebáceas modificadas) e menos comumente das glândulas do saco anal (glândulas apócrinas dos sacos anais). A causa dos tumores da glândula perianal é desconhecida. Entretanto, as glândulas perianais e seus tumores podem ser modulados por hormônios sexuais (BENNETT et al., 2002; SCOTT et al., 1996). Localizam-se no tecido subcutâneo, ao redor do ânus anal, na base da cauda e lateral do prepúcio (GOURLEY; GREGORY, 1992). Os tumores perineais também podem originar-se de estruturas epiteliais não específicas e estruturas mesenquimais dessa região: epiderme, glândulas sebáceas, folículo piloso, tecido fibroso e musculatura lisa (BERROCAL et al., 1989).

De acordo com Shelley (2002), a maioria dos adenomas é hormônio - dependente e regredem em tamanho após a castração, em contraposição aos adenocarcinomas, onde a castração não seria benéfica. Os adenomas perianais correspondem a mais de 80% das neoplasias dessa região e correspondem ao terceiro tipo mais prevalente encontrado em cães machos (GOLDSCHMIDT; ZOLTOWSKI, 1981; MARCHEVSKY et al., 1980; SHELLEY, 2002).

Dentre os fatores de risco, pode-se incluir: idade (média acima de 10,7 anos) e o fato de serem machos segundo Goldschmidt e Zoltowski (1981). Assim a ocorrência seria em machos inteiros, apresentando adenoma perianal principalmente, implicando em dependência androgênica (BENNETT et al., 2002); e adenocarcinoma perianal em machos castrados ou intactos, implicando em independência hormonal. Segundo Evans e Pierrepont (1975), as células tumorais provenientes de adenomas anais possuem receptores seletivos em suas frações citosólicas para androstenediol trihidratado, reforçando ainda mais a dependência androgênica dessas formações neoplásicas.

Adenomas perianais em fêmeas ocorrem quase exclusivamente em animais ovário-histerectomizados, nos quais o estrógeno não suprime o crescimento tumoral. Raramente a secreção de testosterona pela adrenal (com ou sem sintomas de hiperadrenocorticism) pode estimular a formação de adenoma perianal (WITHROW, 1997). Em contrapartida, DOW et al. (1988) relataram um caso de uma cadela castrada com hiperadrenocorticismismo pituitário-dependente, que apresentou adenoma perianal e hipertestosteronemia, concluindo esses autores, que o aparecimento de uma neoplasia andrógeno ou estrógeno responsivo em cão castrado, poderia ser indicação precoce de hiperfunção adrenocortical.

Cães portadores de adenomas perianais muitas vezes apresentam simultaneamente tumores testiculares de células intersticiais (HEDLUND, 1997; WILSON; HAYES, 1979).

Metástases de adenocarcinoma de glândula perianal podem ocorrer em pulmões, fígado, baço, linfonodos ilíacos e lombares.

Apesar de alguns tumores perianais serem assintomáticos, constipação e disquezia podem ocorrer ao se tornarem grandes e invasivos. O crescimento progressivo da formação ou a escoriação da fina pele da região perineal geralmente provoca hemorragia (HEDLUND, 1997).

Os tumores perianais freqüentemente manifestam-se clinicamente como massas aumentadas, sendo que os adenocarcinomas sempre são acompanhados por sintomas sistêmicos, principalmente poliúria e polidipsia correlacionados com hipercalcemia e hipofosfatemia (BENNETT et al., 2002; BERROCAL et al., 1989). A síndrome paraneoplásica é definida como um pseudohiperparatireoidismo. Segundo Meuten et al. (1981) e Yarrington et al. (1981), o pseudohiperparatireoidismo se caracteriza quando clinicamente há hipercalcemia associada à uma neoplasia maligna, glândula parótidas inativas e ausência de metástases ósseas.

Acredita-se que uma proteína relacionada ao paratormônio é sintetizada pelo tecido do adenocarcinoma e que induz a síndrome da hipercalcemia maligna no cão, caracterizada por aumento dos níveis séricos de cálcio, de vitamina D, diminuição dos níveis séricos de fósforo, paratormônio e aumento da reabsorção óssea. Segundo Meuten et al. (1983) aproximadamente 90% dos cães com adenocarcinoma são hipercalcêmicos.

Os mecanismos moleculares que promovem o crescimento de tecidos andrógeno-dependentes não estão totalmente entendidos. Sabe-se que os andrógenos evitam a apoptose das células epiteliais como as da próstata, e, a ablação desse hormônio na castração, leva a inibição da proliferação celular e ativação da apoptose das células andrógeno-dependentes. Alguns fatores, como fator de crescimento ligado à proteína (IGFBP), recentemente, têm sido descritos como moduladores da apoptose via modulação da insulina (HUYNH et al., 2001 b). Apesar de não ter sido comprovada tal ação, esses dados indicam que andrógenos têm ação multifatorial regulando e balanceando a proliferação, diferenciação e apoptose celular. Hormônios como andrógenos e estrógenos regulam uma variedade de tecidos e genes específicos, sempre associados ao câncer. Estes incluem as conexinas, uma família de pelo menos 20 genes, os quais medeiam à formação das junções gap (HABERMANN et al., 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudo retrospectivo sistemático de 1984 à 2004 a fim de se estabelecer a casuística dos tumores de glândula perianal nos arquivos do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP, bem como as principais conexinas presentes na glândula normal, hiperplásica e neoplásica e o índice de proliferação celular e apoptose nessas neoplasias.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a-** Caracterizar por Western blot e imunoistoquímica as principais conexinas presentes em glândulas normais.
- b-** Identificar por Western blot e imunoistoquímica as alterações na expressão das conexinas em hiperplasias e neoplasias de glândulas perianais de cães.
- c-** Quantificar os índices de proliferação celular e de apoptose em glândulas perianais normais, hiperplásicas e neoplásicas de cães.

4. MATERIAL e MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Para a realização do presente estudo, foram utilizados:

A. Blocos e lâminas dos arquivos do Departamento de Patologia da FMVZ/ USP, de 1984 ‘a 2004, com tumores benignos e malignos e hiperplasia de glândula perianal da espécie canina, machos e fêmeas com diferentes idades e sexos, para triagem em re-análise.

B. Cães submetidos à necrópsia no Departamento de Patologia da FMVZ/ USP (para obtermos glândulas perianais normais e à fresco) e cães submetidos à cirurgia de ablação de glândula perianal pelo Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP para a obtenção dos vários tipos de neoplasias e hiperplasia em material à fresco. As glândulas assim obtidas foram divididas em duas partes: uma parte da glândula perianal foi congelada a -80oC (normal e alterada), nas quais usamos o método de Western blot e a outra parte da glândula perianal foi fixada em methacarn para os métodos de imunofluorescência.

4.1.1. Classificação das neoplasias

Neste trabalho, apoiando-se principalmente na morfologia descritiva e em menor extensão na histogênese, procurou-se seguir a classificação de BERROCAL et al., 1989, comparando-a com a encontrada nos arquivos do Departamento de Patologia FMVZ/USP cuja classificação fora baseada na classificação da Organização Mundial da Saúde (GOLDSCHMIDT et al., 1998).

BERROCAL et.al (1989)	OMS (1998)
Adenoma do Grupo I	Adenoma de Glândula Hepatóide
Adenoma do Grupo II Moderadamente Diferenciado	Adenoma de Glândula Hepatóide
Adenoma do Grupo II Pouco Diferenciado	Epitelioma de Glândula Hepatóide
Carcinoma do Grupo III	Carcinoma de Glândula Hepatóide

Na classificação mundial encontramos três tipos de padrões histológicos:

- **Adenoma de Glândula Hepatóide**, tumor benigno de glândulas sebáceas modificadas composto por células hepatóides. Constituídos por trabéculas e cordões de células tumorais subdivididos, bem vascularizados e capsulados. Na periferia dos lóbulos encontramos pequenas células basalóides ou também chamadas de células de reserva (GOLDSCHMIDT et al., 1998).
- **Epitelioma de Glândula Hepatóide**, tumor de baixo grau de malignidade caracterizado pela predominância de células basalóides (GOLDSCHMIDT et al., 1998).
- **Carcinoma de Glândula Hepatóide**, tumor maligno caracterizado pela diferenciação das células hepatóides em células epiteliais (GOLDSCHMIDT et al., 1998).

Na classificação de BERROCAL encontramos quatro tipos de padrões histológicos:

- **Adenoma do Grupo I**, tumor bem diferenciado com lóbulos compostos de célula grandes e médias, arredondadas ou poligonais, com núcleo vesicular e rodeado por pequenas células com núcleo hipercromático redondo ou alongado.
- **Adenoma moderadamente diferenciado (grupo II)**, tumor com muitas células de reserva rodeando grupos de células bem diferenciadas.
- **Adenoma pouco diferenciado (grupo II)**, tumor com predominância de células de reserva alongadas e com núcleo alongado, rodeando pequenos grupos de células bem diferenciadas ou espalhadas isoladamente. Poucas ou moderadas figuras de mitose. Estruturas semelhantes a ducto com queratinização central podem estar presentes. Apesar do tumor ter algumas características de malignidade não há invasão de linfonodos ou vasos sanguíneos.
- **Carcinoma (grupo III)**, tumor sem diferenciação celular, formado por grupos celulares ou células neoplásicas isoladas, separadas por finos septos de tecido conjuntivo e rodeadas por estruturas vasculares. Infiltração em tecidos adjacentes e com padrão de crescimento sólido, em rosetas, tubulares ou mistos. Células tumorais pleomórficas de tamanho médio com núcleo pleomórfico. Inúmeras figuras de mitose.
- **Outros tipos (grupo IV)**

Após o término da etapa classificatória, selecionou-se 6 tipos de cada neoplasia, hiperplasia e de glândula perianal normal do material fixado em methacarn e embocado em parafina para quantificar a taxa de proliferação e apoptose das células da glândula perianal, bem como identificar as principais conexinas presentes em cada um dos tipos selecionados, utilizando-se métodos imunoistoquímicos (a espessura dos cortes foi de cinco micrômetros) e, do material congelado a -80° C, retirou-se 40mg para a estimativa das conexinas, fazendo-se para tanto, uma imunomarcagem por Western blot.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Método de Hematoxilina – Eosina (H & E)

4.2.2. Método de fluorescência para se determinar os corpúsculos apoptóticos

Na aplicação da técnica de fluorescência utilizou-se um microscópio Nikon com sistema de fluorescência (FITC – comprimento de onda 465-495) , as lâminas do arquivo e as lâminas com material do hospital veterinário coradas pela técnica de H & E.

A taxa de apoptose nas neoplasias malignas e benignas das glândulas perianais foi determinada pela quantificação dos corpúsculos apoptóticos morfológicamente e propriedades de imunofluorescência. Recentemente verificou-se que as células apoptóticas apresentam autofluorescência que é devida à coloração histoquímica pela eosina (WOOD; NEWCOMB, 1999).

A apoptose pode ser assim identificada e quantificada em cortes corados com Hematoxilina – Eosina (morfologia).

4.2.3. Método imunoistoquímico para a quantificação da proliferação das células das glândulas perianais (PCNA)

Utilizou-se o método estreptavidina- biotina- peroxidase, através do anticorpo monoclonal de camundongo anti-PCNA (DAKO) diluído 1:200 em 6 amostras de cada grupo (normal, hiperplásico, adenoma do Grupo I, adenoma do Grupo II moderadamente diferenciado, adenoma do Grupo II pouco diferenciado e carcinoma do Grupo III). Fragmentos de glândula perianal fixados em methacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético) durante 8 à 12 horas foram submetidos ao método imunoistoquímico da estreptavidina-biotina-peroxidase. Seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário anti- imunoglobulinas de camundongos, biotilado, e a aplicação do complexo streptavidina, biotina e peroxidase (“kit” duet, da DAKO, Califórnia, EUA). As células positivas foram evidenciadas após coloração com DAB. Todas as células, em 4 diferentes campos, foram contadas, aproximadamente 1000 células; aquelas com núcleo corado em marrom, consideradas positivas. A porcentagem de células em proliferação foi obtida dividindo-se o número de células coradas pelo total do número de células contadas em cada grupo.

O anticorpo monoclonal contra o antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA), tornou-se uma ferramenta importante para avaliar a proliferação celular *in situ* (WROBEL; BICKEL; KUJAT, 1996). O uso desses métodos novos e mais sofisticados veio substituir a contagem de células em mitose, uma vez que, dentro de uma população celular em proliferação, a fase de mitose (M) é a mais curta e tem o menor número de células entre as células que estão em proliferação (LINDEN et al., 1992). O PCNA, antígeno nuclear de células em proliferação/ ciclina, é uma proteína nuclear estável, não histona, regulada pelo ciclo celular, onde o seu grau de síntese está diretamente correlacionado com o grau de células em proliferação (LINDEN et al., 1992). É identificada como uma proteína auxiliar de 36 kDa para o DNA delta polimerase, com uma meia vida biológica um pouco mais longa do que 20 horas (WROBEL; BICKEL; KUJAT, 1996).

Através da técnica de citometria de fluxo foi demonstrado que os níveis de PCNA aumentam 2 ou 3 vezes entre as fases iniciais de G1 (fase anterior à síntese de DNA) e o início da fase S (fase de síntese de DNA), e mantém-se num “platô” durante a fase G2 (fase que precede a mitose). Células em mitose sincronizadas têm os níveis diminuídos de PCNA semelhantes aos níveis obtidos no início da G1 (LINDEN et al., 1992).

Bravo e MacDonald-Bravo (1987) demonstraram através de métodos de imunofluorescência, que existem duas populações de PCNA. Uma população é nucleoplasmática, correspondendo ao PCNA presente em níveis baixos, como os que ocorrem em células em repouso, capazes de entrar em divisão. Esta população é altamente solúvel, facilmente extraída por detergentes, porém, não são detectáveis em células fixadas em solventes orgânicos. A segunda forma, insolúvel, de PCNA, está associada às estruturas nucleares específicas, firmemente associada aos locais de replicação do DNA e, pensa-se, tenha um papel fundamental na síntese do DNA eucariótico. Esta forma não é extraída com solventes orgânicos e pode ser detectada em tecidos fixados. O anticorpo monoclonal, clone PC10, foi descrito e caracterizado por Wassem e Lane (1990), citado por WROBEL; BICKEL e KUJAT em 1996. A aplicação do PC10 na imunoistoquímica tem sido usada para estudar a proliferação celular em tumores (KIKUCHI; NISHIKAWA, 1997) e em tecido em desenvolvimento (CASASCO et al., 1993). Quanto à fixação e o processamento do tecido ocorrem de forma adequada, o resultado da marcação imunoistoquímica com PC10 reflete diretamente o estado de proliferação da célula. O núcleo positivo para PCNA é observado durante as fases do ciclo celular G1, S e G2/M, já os núcleos na fase G0 (descanso) são negativos à marcação (WROBEL; BICKEL; KUJAT, 1996). Segundo LINDEN (1992) o pré-tratamento com ácido pode reduzir a coloração imunoistoquímica do clone PC10. A digestão enzimática não é necessária para desmascarar o antígeno e as proteases são descritas como destrutivas da coloração de imunoistoquímica.

4.2.4. Método imunofluorescência para marcação das conexinas.

As glândulas perianais provenientes do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP e da necrópsia foram previamente fixadas, por 8 - 12 horas, em Methacarn, após esse período o fixador foi substituído por álcool 70^oGl, 80^oGl, 95^oGl, álcool absoluto e xilol e emblocados em parafina. As lâminas continham cortes das glândulas com 3-5 µm de espessura sendo que uma delas corada em H&E (para o diagnóstico e quantificação das células apoptóticas) e as restantes para a marcação das Cxs e PCNA.

As lâminas com cortes histológicos da glândula perianal foram desparafinizadas e re-hidratadas e, em seguida, lavadas com PBS. Os anticorpos contra as conexinas 26, 32 e 43 (Zymed, policlonal) foram usados na diluição 1: 100, permanecendo overnight a 4° C em

câmara úmida. As lâminas foram mergulhadas em PBS por 5 vezes e acrescidas do anticorpo secundário biotinilado FIT mouse na diluição de 1:100 durante duas horas. No caso da Cx 26, o anticorpo secundário foi biotinilado anti-mouse (LSAB) por uma hora. As lâminas a seguir foram incubadas com Streptavidina, por uma hora, no escuro. Ao final as lâminas foram montadas com Vectashield Mounting Medium (Vector labs). As imagens foram capturadas no microscópio de fluorescência.

4.2.5. Método de Western blot para conexinas 26, 32 e 43

Para se determinar as conexinas presentes na glândula perineal normal, hiperplásica e neoplásica (benigna e maligna de cães), usaram-se inicialmente as conexinas 43, 26, 32 por serem as mais comuns. Para tanto, colheram-se amostras de tecido de glândula perineal normal, hiperplásica e neoplásica, as quais foram acondicionadas à -80°C. Todas as etapas seguintes foram realizadas com amostras à -4°C.

Princípio da técnica:

Esta técnica permite a detecção de uma proteína de interesse em um homogenato celular com a ajuda de anticorpos específicos. As proteínas são separadas segundo seu tamanho em um gel de poliacrilamida sob condições denaturantes (SDS-PAGE), seguidas de transferência para uma membrana de nitrocelulose ou de nylon (PVDF). A proteína de interesse é em seguida revelada graças a anticorpos primários específicos, que serão eles mesmos reconhecidos por anticorpos secundários conjugados a uma peroxidase (ou fosfatase alcalina), metabolizando o DAB. Esta enzima permite a catálise de uma reação gerando complexos coloridos que podem ser diretamente reconhecidos.

A Cx 43, por exemplo, apresenta vários perfis (várias bandas de pesos moleculares diferentes) segundo o tecido de origem ou de tratamentos farmacológicos (SAEZ et al., 1997).

Para tanto, fragmentos com 40 mg de tecido glandular previamente acondicionado a -80°C foram submetidos à lise celular através de homogeneização no Tissue Teator na velocidade máxima. Todas as etapas a seguir foram realizadas com as amostras mantidas à -4°C. A homogeneização foi realizada em tris - HCl 1M, pH 6,8, contendo SDS 20% e glicerol 10% e, então, centrifugado à 15000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi retirado e acrescido

de tris-HCl 1M, pH 6,8, contendo SDS 20% e glicerol 10%, DDT 1M e PMSF 10nM e centrifugado à 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e conservado à -80°C até análise. A concentração de proteína total foi estimada com o reagente BioRad Protein Assay (Bio-Rad labs, Hercules, CA).

Na eletroforese utilizou-se 150 µg de proteína acrescida de azul de bromofenol, separada em SDS-PAGE a 10%. A eletroforese foi realizada a 40W por cerca de 5 horas. Como marcador molecular utilizou-se Kaleidoscopie Padrão Pré Corado (Bio-Rad Labs). Após a eletroforese as proteínas foram transferidas a 25W por 12 horas para uma membrana de PDVF 8,0 X 5,0cm² (Trans-Blot SD cell; bio-Rad labs), previamente umedecida com metanol por 30 minutos. Em seguida a membrana foi 3 vezes lavada, durante 15 minutos, em TTBS 0,2% contendo tween 20. A membrana foi incubada em leite desnatado (Skin Milk) 5% diluído em TTBS por 2 horas sob leve agitação à temperatura ambiente. Os excessos da membrana foram cortados, descartados e a membrana incubada por 2 horas à temperatura ambiente numa solução de anticorpo primário (Cxs 43, 32 e 26), diluído em TTBS 0,2% contendo Skim Milk 1%. Utilizou-se o anticorpo policlonal anti-rabbit diluído 1:100 (para as conexinas 43 e 32) e 1:200 (para a conexina 26). A membrana foi lavada em TTBS e o excesso de tampão removido em papel de filtro watman. Procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário anti-mouse conjugado à peroxidase (1:1000) por 2 horas nas mesmas condições acima citadas. A revelação foi efetuada mergulhando-se a membrana por alguns segundos em uma solução contendo diaminobenzidina (DAB)-níquel acrescido de 20 µl de peróxido de hidrogênio a 30%. O bloqueio da reação deu-se após mergulho da membrana em água Mili Q, a seguir a membrana foi fotografada.

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a quantificação das células em apoptose e as em proliferação celular, as lâminas com os cortes histológicos foram submetidos a exame morfométrico em sistema de análise de imagem computadorizada. O sistema utilizado foi o Image Pro-Plus (Leica). Uma vez calibrado o sistema, cada célula apoptótica ou cada célula marcada com anticorpo monoclonal de camundongo anti-PCNA foi delimitada por um cursor (manipulada pelo próprio mouse do computador), e, imediatamente após esse procedimento, foi calculado pelo sistema o número de células em apoptose ou proliferação celular, num universo de mil células. As médias de

seis animais de cada grupo foram comparadas utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA), estabelecendo-se o nível de significância em 95 % .

4.3.1. Índice de crescimento ajustado

Os resultados obtidos pela contagem de células perianais em proliferação celular (PCNA) e contagem dos corpúsculos apoptóticos (CA) nos vários processos neoplásicos, hiperplásicos e normais, permitiram que o índice de crescimento dessas populações celulares fossem analisadas (KONG; RINGER, 1996). Para tanto dividimos a média da contagem de PCNA (IcPCNA) em 1000 células, pela média de contagem de marcação CA (IcCA) em 1000 células (sendo Ic o índice de coloração). As médias de seis animais de cada grupo foram comparadas utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA), estabelecendo-se o nível de significância em 95 % .

5. RESULTADOS

5.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E TIPOS DE NEOPLASIAS

5.1.1 Classificação dos arquivos do Departamento de Patologia da FMVZ dos processos hiperplásicos e neoplásicos de glândula perianal da espécie canina segundo a OMS (GOLDSCHMIDT et al., 1998)

O levantamento retrospectivo das alterações histopatológicas de glândula perianal dos arquivos da FMVZ que seguiu a classificação da OMS mostrou que 129 dos casos apresentavam adenocarcinomas, 5 epiteliomas, 86 adenomas, 9 hiperplasias e outros :4 glândulas com fibrossarcoma, 2 com hemangioma e 1 fibroma.(Quadro 2, Gráfico 1)

Nº DE CASOS	TIPO
9	Hiperplasia
5	Epitelioma
86	Adenoma
129	Adenocarcinoma
4	Fibrossarcoma
2	Hemangioma
1	Fibroma

Quadro 2- Números de casos encontrados dos vários tipos histológicos de processos hiperplásicos e neoplásicos de glândula perianal na espécie canina encontrados nos arquivos do Departamento de Patologia, FMVZ-USP, jan 1984 à dez 2004 de acordo com a classificação da OMS.

Gráfico 1-Distribuição da análise percentual dos processos hiperplásicos, neoplasias benignas e maligna de glândula perianal na espécie canina encontrados nos arquivos do Departamento de Patologia, FMVZ-USP, jan 1984 à dez 2004 de acordo com da classificação da OMS

5.1.2. Re-classificação dos processos hiperplásicos e neoplásicos de glândula perianal da espécie canina, dos arquivos do Departamento de Patologia da FMVZ, segundo a classificação de Berrocal

Após cuidadoso exame dos cortes histológicos de glândulas perianais (Figura 22), feito por 2 observadores e, conforme a classificação de Berrocal et al.,1989, averiguou-se que 9 das glândulas eram hiperplásicas; 49 apresentavam adenomas do grupo I, 81 com adenomas do grupo II (moderadamente diferenciado); 46 com adenomas do grupo II (pouco diferenciado); 48 com carcinomas do grupo III. Ainda, encontrou-se no grupo IV: 4 glândulas com fibrossarcomas, 2 com hemangiomas e 1 fibroma (Quadro 3, Gráfico 2).

Nº DE CASOS	TIPO
9	Hiperplasia
49	Adenoma grupo I
86	Adenoma mod diferenciado Grupo II
46	Adenoma pouco diferenciado Grupo II
48	Carcinoma Grupo III
4	Fibrossarcoma Grupo IV
2	Hemangioma Grupo IV
1	Fibroma Grupo IV

Quadro 3- Número de casos encontrados nos vários tipos histológicos de processos hiperplásicos e neoplásicos de glândula perianal na espécie canina nos arquivos do Departamento de Patologia, FMVZ-USP, jan 1984 à dez 2004 de acordo com da classificação de Berrocal et al,1989

Gráfico 2 - Distribuição da análise percentual dos processos hiperplásicos, neoplasias benignas e maligna de glândula perianal na espécie canina encontrados nos arquivos do Departamento de Patologia, FMVZ-USP, jan 1984 à dez 2004, de acordo com a classificação de Berrocal et al, 1989

5.1.3. Levantamento retrospectivo dos casos de neoplasias e hiperplasia na glândula perianal da espécie canina conforme o sexo, idade e raça

Após estudo da ficha clinica dos animais, quando presente, observamos que a maior frequência de neoplasias eram em animais machos com idade superior à 8 anos e 229 animais machos e 11 fêmeas apresentavam alterações histopatológicas nas glândulas perianais (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Distribuição da análise percentual de processos hiperplásicos e neoplásicos de glândula perianal na espécie canina encontrados nos arquivos do Departamento de Patologia, FMVZ-USP, jan 1984 à dez 2004, conforme o sexo

Em relação à idade dos cães, 24 (10%) não tiveram a idade especificada, 202 (84%) tinham idade superior à 8 anos e 14 (6%) com idade inferior à 8 anos (Gráfico 4).

Gráfico 4- Distribuição da análise percentual de processos hiperplásicos e neoplásicos de glândula perianal na espécie canina encontrados nos arquivos do Departamento de Patologia, FMVZ-USP, jan 1984 a dez 2004, de acordo com a idade do animal

Analisando a ocorrência das raças mais acometidas com alterações histopatológicas de glândula perianal, obtivemos que 88 (37%) dos animais eram SRD, 28(12 %) Poodle, 26(11 %) Pastor Alemão e 19(8%) Husky Siberiano, 7 (3%) Daunshund , 7(3%) Pinscher e 65(27%) de outras raças (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Distribuição da análise percentual de processos hiperplásicos e neoplásicos de glândula perianal na espécie canina encontrados nos arquivos do Departamento de Patologia, FMVZ-USP, jan 1984 à dez 2004, de acordo com a raça do animal.

Figura 22-Fotomicrografia dos tipos de neoplasias (benignas e malignas) e hiperplasia encontradas em glândula perianal, na espécie canina, conforme a classificação de Berrocal et al., 1989. **A.** Hiperplasia de glândula perianal (X10), **B.** Adenoma de glândula perianal Grupo I (X20), **C.** Adenoma moderadamente diferenciado Grupo II(X20), **D.** Adenoma pouco diferenciado Grupo II (X20) **E.** Carcinoma Grupo III (X40)

5.2. QUANTIFICAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA GLÂNDULA PERIANAL

Os resultados referem-se à capacidade de proliferação celular e foi estudada com auxílio do marcador PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) (Figura 23).

Figura 23-Microfotografia da marcação de PCNA em glândula perianal de cães. **A.** Glândula normal **B.** Hiperplásica **C.** Adenoma do grupo I **D.** Adenoma moderadamente diferenciado grupo II **E.** Adenoma pouco diferenciado grupo II **F.** Carcinoma do grupo III (X40)

Os Carcinomas do Grupo III apresentaram maior taxa de proliferação celular ($68,61 \pm 2,74^{***}$) quando comparados aos Adenomas do Grupo I ($15,17 \pm 2,66$), Grupo II

Moderadamente (19.99 ± 3.26 ou Grupo II Pouco diferenciados ($36.82 \pm 8.75^*$), Hiperplásicas (20.0 ± 8.01) e Normais (11.75 ± 2.93) (Tabela 1, Gráfico 6, Apêndice 1).

Tabela 1. Quantificação dos núcleos positivos para o PCNA de glândulas perianais normais, hiperplásicas e neoplásicas de cães. (médias $\pm$ desvio padrão 10^{-3})

	Normal	Hiperplásico	Grupo I Adenoma	Grupo II Adenoma moderadamente diferenciado	Grupo II Adenoma pouco diferenciado	Grupo III Carcinoma
	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6
PCNA	11.75 ± 2.93	20.06 ± 8.01	15.17 ± 2.68	19.99 ± 3.26	$36.82 \pm 8.75^*$	$68.71 \pm 2.74^{**}$

one-way Análise de variância (ANOVA) (intervalo de confiança 95%)

* Diferença estatisticamente significativa entre grupo II (pouco diferenciado) e grupo normal, $p < 0.05$. ** Diferença estatisticamente significativa entre grupo III (carcinoma) e grupo normal, $p < 0.001$.

Gráfico 6-Análise do Índice de coloração (Ic) de PCNA determinado por imunoistoquímica . * Diferença estatisticamente significativa entre grupo II (pouco diferenciado) e grupo normal, $p < 0.05$. ** Diferença estatisticamente significativa entre grupo III (carcinoma) e grupo normal, $p < 0.001$

5.3. QUANTIFICAÇÃO DA APOPTOSE DAS GLÂNDULAS PERIANAIS.

Realizamos a análise de apoptose através de microscopia de fluorescência e obtivemos imagens com células apoptóticas, as quais apresentaram o citoplasma com fluorescência destacando-se completamente das outras células no campo (Figura 24).

Figura 24- Fotomicrografia das células em apoptose dos processos neoplásicos e hiperplásico em glândula perianal da espécie canina sob microscopia de luz e de fluorescência. À direita fragmentos corados com H & E sob MO e à esquerda sob MF observa-se o citoplasma fluorescente das células em apoptose. **A.** grupo II moderadamente diferenciado, **B.** Grupo II pouco diferenciado, **C.** Carcinoma Grupo III, **D.** Glândula normal, **E.** Glândula hiperplásica (X40)

Os resultados referem-se à quantificação dos corpúsculos apoptóticos morfológicamente e por sua propriedade de fluorescência.

Carcinomas apresentaram, também, maior taxa de apoptose ($1.85 \pm 0.53^{***}$) quando comparados aos Adenomas do Grupo I (0.96 ± 0.20), do Grupo II Moderadamente (0.94 ± 0.21) ou do Grupo II Pouco ($1.66 \pm 0.54^{***}$) diferenciados, Hiperplásicas (0.43 ± 0.18) e Normais (0.43 ± 0.11). (Tabela 2, Gráfico 7, Apêndice 2)

Tabela 2. Quantificação dos corpúsculos apoptóticos (CA) determinados por fluorescência de glândulas perianais normais, hiperplásicas e neoplásicas de cães (médias $\pm$ desvio padrão 10^{-3})

	Normal	Hiperplásico	Group I Adenoma	Group II Adenoma moderadamente diferenciado	Group II Adenoma pouco diferenciado	Group III Carcinoma
	n=6	n=6	n=6	n=6	n=5	n=6
CA	0.43 ± 0.11	0.43 ± 0.18	0.96 ± 0.20	0.94 ± 0.21	$1.66 \pm 0.54^{***}$	$1.85 \pm 0.53^{***}$

one-way Análise de variância (ANOVA) (intervalo de confiança 95%)

(*** estatisticamente significante entre o grupo I (pouco diferenciado), grupo III (carcinoma) e grupo normal, $p < 0.001$.)

Gráfico 7- Análise dos corpúsculos apoptóticos de glândulas perianais normais, hiperplásicas e neoplásicas de cães (***) estatisticamente significante entre o grupo I (pouco diferenciado), grupo III (carcinoma) e grupo normal, $p < 0.001$.)

5.4. ANÁLISE DO ÍNDICE DE CRESCIMENTO AJUSTADO

Os resultados referem-se à análise do índice de crescimento ajustado ($ICA = I_{c_{pcna}} / I_{c_{ca}}$) (Tabela 3, Gráfico 8, Apêndice 3).

Tabela 3. Índice de crescimento ajustado de glândulas perianais normais, hiperplásicas e neoplásicas de cães (médias $\pm$ desvio padrão $\times 10^{-3}$)

	Normal	Hiperplásico	Group I Adenoma	Group II Adenoma moderadamente diferenciado	Group II Adenoma pouco diferenciado	Group III Carcinoma
	n=6	n=5	n=6	n=5	n=5	n=5
CA	3.94 $\pm$ 1.45	2.21 $\pm$ 1.31****	6.51 $\pm$ 1.95	4.24 $\pm$ 1.04	4.70 $\pm$ 2.74	3.04 $\pm$ 1.73*****

one-way Análise de variância (ANOVA) (intervalo de confiança 95%)

(**** Diferença estatisticamente significativa entre o grupo I (adenoma) e hiperplasia $p < 0.01$)

(***** Diferença estatisticamente significativa entre o grupo I (adenoma) e carcinoma III $p < 0.05$)

Gráfico 8- Análise do Índice de coloração ajustado de glândulas perianais normais , hiperplásicas e neoplásicas de cães (**** Diferença estatisticamente significativa entre hiperplasia e adenoma (grupo I) $p < 0.01$; *****Diferença estatisticamente significativa entre carcinoma (grupo III) e adenoma (grupo I), $p < 0.05$)

5.5.IMUNOFLUORESCÊNCIA

5.5.1. Expressão da Conexina 43

Nos carcinomas não observamos marcação apesar de existirem áreas marcadas (vistas anteriormente, também, em H & E, em que a glândula histologicamente era normal). Nos adenomas pouco diferenciados do grupo II, a marcação, na maioria das células, era citoplasmática, enquanto em muitas outras células não observamos marcação para Cx 43 (figura 25).

Figura 25- Fotomicrografia da imunomarcção da Cx 43 nos vários processos hiperplásicos e neoplásicos e normal de glândula perianal. Em verde, à esquerda, sob microscopia de fluorescência e em amarelo, à direita, a mesma área em MO. **A** glândula normal (X20), **B**. Hiperplásica (X20), **C** Adenoma grupo I (X20), **D** Adenoma moderadamente diferenciado grupo II (X20), **E** Adenoma pouco diferenciado grupo II (X20) e a foto **E** do meio (X40), **F**. Carcinoma do grupo III e á direita uma área normal do carcinoma (X40), **Coração** como controle positivo

5.5.2. Expressão da Conexina 26

Figura 26- Fotomicrografia da imunomarcação da Cx 26 nos vários processos hiperplásicos e neoplásicos e normal de glândula perianal. **A** glândula normal (imersão), **B**. Hiperplásica (X40), **C** Adenoma grupo I (imersão), **D** Adenoma moderadamente diferenciado grupo II (X40), **E** Adenoma pouco diferenciado grupo II (X40), **F**. Carcinoma do grupo III (X40), **Fígado** como controle positivo (X20)

5.5.3. Expressão da Conexina 32

Figura 27- Fotomicrografia da imunomarcagem da Cx 32 nos vários processos hiperplásicos e neoplásicos e de glândula perianal normal. **A** glândula normal (X40), **B**. Hiperplásica (X40), **C** Adenoma grupo I (X40), **D** Adenoma moderadamente diferenciado grupo II (X40), **E** Adenoma pouco diferenciado grupo II (X40), **F**. Carcinoma do grupo III (X40), **Fígado** como controle positivo (X40)

5.6. WESTERN BLOT DA CX 43, 26

5.6.1. Imunoblot para Cx 43

O coração expressa os maiores níveis de expressão da Cx 43 que qualquer outro órgão e, assim, foi usado como controle para a otimização da reação.

A expressão de Cx 43 na glândula perianal normal (H4) foi inferior à da glândula perianal hiperplásica (H2). Menor expressão foi observada no adenoma grupo I (H7), grupo II moderadamente diferenciado (H8 e H1) e grupo II pouco diferenciado (H9). Nos carcinomas grupo III houve esboço da expressão da Cx 43 (H3), mas, entretanto, no H5, carcinoma, houve significativa expressão de Cx43 (figura 28).

Figura 28. Fotografia do Imunoblot em glândula perianal normal, hiperplásica, adenoma grupo I, II (moderadamente e pouco diferenciado) e carcinoma grupo III. MMP: marcador de peso molecular. CTLE: controle. A seta aponta para o marcador de peso molecular referente a 40 kDa.

5.6.2. Imunoblot para Cx 26

O fígado expressa altos níveis de expressão da Cx 26 e, assim, foi usado como controle para a otimização da reação. Pelo imunoblot observamos, em todos os tipos histológicos da glândula perianal, dímeros da Cx26 com peso molecular entre 50 e 60kDa (Figura 29)

Figura 29- Fotografia do Imunoblot em glândula perianal normal (H4), hiperplásica (H2), adenoma grupo I (H7), grupo II [moderadamente (H1 e H8) e pouco diferenciado(H9)] e carcinoma grupo III(H3 e H5). A seta aponta para o marcador de peso molecular referente a 26 kDa. Em todos os processos patológicos e na glândula perianal normal, a conexina estudada apresentava-se como dímeros da Cx 26 com peso molecular entre 50 e 60KDa. MMP: marcador de peso molecular. CTLE controle

6. DISCUSSÃO

As glândulas perianais de cães estão freqüentemente sujeitas ao desenvolvimento de hiperplasias e de neoplasias benignas e malignas. Este trabalho visou contribuir para o conhecimento das glândulas perianais normais e portadoras de processos patológicos.

Face à dificuldade em diagnosticar com precisão as neoplasias de glândula perianal em cães e à escassez de dados sobre as mesmas, evidenciada pela literatura, houve por bem contribuir, somando e acrescentando informações ao aprimoramento diagnóstico, além de acrescentar dados complementares ao estudo da sua carcinogênese.

Comparando a classificação da OMS (1998) com a classificação de BERROCAL et.al. (1989), com a finalidade de facilitar o patologista na sua classificação, bem como uniformizar a linguagem utilizada pelos clínicos, pudemos perceber que a grande diferença é que na classificação de Berrocal et al. (1989) há um padrão histológico intermediário que se encaixaria entre o Adenoma de Glândula Hepatóide e o Epitelioma de Glândula Hepatóide, denominado na classificação de Berrocal de Adenoma do Grupo II Moderadamente Diferenciado.

Optamos em adotar a classificação de Berrocal por ela levar em consideração o aspecto histológico do crescimento neoplásico, a presença de células de reserva e a invasão de tecidos adjacentes, sendo que os autores correlacionaram esses achados com o prognóstico dos pacientes. Nos casos, por exemplo, dos adenomas do grupo II, pouco diferenciado, apesar de haver quantidades variáveis de células de reserva e algumas figuras de mitose, não foi constatada a invasão tecidual nem metástases, sendo que os autores, Berrocal et al.(1989), correlacionaram esses achados com o prognóstico dos pacientes. Infelizmente não tivemos a possibilidade de realizar o seguimento clínico do destino dos pacientes que nos forneceram o material para o estudo.

No re-exame dos cortes histológicos obedecendo à classificação de Berrocal et al. (1989), constatamos que a maioria dos casos enquadrava-se dentro da classificação de adenoma do Grupo II, principalmente do tipo moderadamente diferenciado e a minoria, enquadrava-se como carcinomas do grupo III.

Ao quantificarmos retrospectivamente os diagnósticos, obtivemos alta percentagem de casos com adenocarcinoma, sendo reduzida a de neoplasias benignas. Deve-se ressaltar que muitos dos casos de adenoma do grupo II pouco diferenciado anteriormente haviam sido

classificados como adenocarcinomas, dada a presença de células pleomórficas e figuras de mitose presentes.

Quanto à predisposição racial, obtivemos que a raça mais acometida por neoplasias perianais (36%) foi a SRD (sem raça definida), talvez por ser o tipo de animal que mais freqüentemente é trazido ao Hospital Veterinário, a segunda raça mais acometida (12%) foi a Poodle e em terceiro lugar, em 11% dos casos, o Pastor Alemão. Nesse sentido, para reconhecermos a real predisposição racial dos cães às alterações das glândulas perianais, acreditamos ser necessário um estudo mais amplo e abrangente. Entretanto, através dos números obtidos, ficou claro que no cenário regional os cães da raça Cocker Spaniel não são considerados como uma raça de alta incidência de casos como relatado na literatura internacional (BERROCAL et al., 1989; GENEVOIS, 1980), pois encontramos a percentagem de 1,66% dos Cockers com este processo patológico.

Relacionando a idade dos animais acometidos e o sexo, as expectativas foram confirmadas com os dados da literatura, pois a maior parte dos casos levantados era de animais na faixa etária acima de oito anos e machos. As células das glândulas perianais têm receptores androgênicos em sua superfície e, desta forma, há controle endócrino para o crescimento e desenvolvimento das glândulas perianais. Estas continuam a desenvolver-se durante a vida do cão por estimulação androgênica. Assim, em machos idosos é comum ocorrer hiperplasia que, subsequente, evolui para adenomas. É provável que os casos de neoplasias em fêmeas estejam associados com a produção endógena de andrógeno, principalmente pela glândula adrenal (GOLDSCHMIDT et al., 1998). Carcinomas desenvolvem-se como resultado de alterações genômicas, e, ao menos nos estágios iniciais da neoplasia, continuam a apresentar a dependência hormonal e, assim, respondem bem a terapia de privação androgênica, ou seja, à castração (PISANI et al., 2006).

Embora os carcinomas perianais respondam bem à privação androgênica, muitos tumores eventualmente reagem de maneira refratária. Muitos mecanismos podem contribuir para a progressão do tumor mesmo após a ablação androgênica: mutações nos receptores androgênicos que permitem que tais receptores respondam a diferentes esteróides e mesmo antiandrógenos; a sinalização aos receptores pode estar aumentada por fatores de crescimento peptídicos e citocinas. Em próstata, por exemplo, o fator de crescimento insulina 1 e o fator de crescimento de queratinócitos são capazes de promover *in vitro* a atividade transcricional dos receptores androgênicos na ausência de andrógenos. Fator de crescimento insulina 1 também aumenta o risco de aparecimento de carcinoma prostático androgênico. Outras citocinas e fatores de ativação como interleucina 6, ciclina E podem ativar as vias de receptores

androgênicos na ausência de andrógenos sendo que a interleucina 6 teve demonstrada essa atividade através da via MAPK (NICKERSON et al., 1999).

Poderíamos então sugerir que os andrógenos possam agir como promotores tumorais, via androgênica, nas glândulas perianais, levando a um aumento da proliferação celular e decréscimo da apoptose, à semelhança do que ocorre na carcinogênese prostática, túbulos seminíferos e outros tecidos andrógenos dependentes (CHODAK et al.,1992; ERKKILA et al.,1997; SIMPSON et al.,1999).

Neste estudo, monitorando a proliferação e morte celular, respectivamente, em cortes seriados, observamos um padrão paralelo de aumento de ambas as quantificações, para os grupos I, II e III. Lin et al. (2006), em um estudo sobre carcinoma prostático, sugeriram que andrógenos e seus receptores androgênicos possam ter funções pró ou anti-apoptóticas por mecanismo não esclarecido. Os autores relataram que andrógenos e seus receptores promovem a apoptose mediada por Bax em células positivas para receptores as quais expressam um pequeno RNA de interferência (siRNA).

Assim, como esperado, houve um aumento progressivo na taxa de núcleos corados para PCNA, à semelhança do que ocorre em outros tecidos neoplásicos (PERENTES et al.,1994), aumentando do tecido normal e neoplásico benigno para o neoplásico maligno (PREZIOSI et al.,1995). Ressaltamos que a taxa de proliferação do tecido hiperplásico não é significativamente diferente das do grupo I e II sendo, entretanto, significativamente diferente dos carcinomas do grupo III ($p < 0,001$). Sugere-se, portanto, que imunoistoquímica para PCNA possa ser usada como ferramenta para auxiliar na distinção de tumores benignos e malignos de glândula perianal, a exemplo de Kong e Ringer (1996), em casos de suspeita de hepatocarcinomas. Analisando os dados da quantificação dos corpúsculos apoptóticos, observamos que os carcinomas e adenomas pouco diferenciados (grupo II) apresentaram diferenças significantes quando comparados ao tecido normal, grupos I e II (Adenoma moderadamente diferenciado) e hiperplásico ($P < 0,001$).

Estes dados, taxa de apoptose e de PCNA, coletivamente, sugerem a semelhança das alterações genômicas no adenoma grupo II pouco diferenciado e carcinomas.

O estudo do índice de crescimento ajustado para cada tecido demonstrou um padrão diferente entre os tecidos, sendo o aumento maior no grupo I, ou seja, os resultados indicam que os adenomas, grupo I, têm um elevado potencial de crescimento ajustado quando comparado aos outros tecidos. Promotores tumorais, como os andrógenos, desempenham papel importante no balanceamento entre a proliferação e a morte celular, levando a intensa proliferação do tecido glandular via receptores de superfície e, eventualmente, diminuindo a

taxa de apoptose. Segundo Kong e Ringer (1995), os promotores são responsáveis também pelo aumento do potencial de crescimento ajustado em lesões pré neoplásicas e acelerando a carcinogênese. O menor valor de ICA determinado em tecido hiperplásico e carcinoma, grupo III, representa uma diminuição no potencial de crescimento apesar de seus maiores níveis de proliferação celular, ou seja, hiperplasia e carcinoma de glândula perianal tem um maior nível de proliferação, mas os adenomas têm um potencial de crescimento maior, levando-se em conta a apoptose. Estes resultados sugerem a importância da apoptose na dinâmica de crescimento das neoplasias, promovidas por andrógenos, durante a carcinogênese.

Nesta primeira fase de nosso estudo, observamos, como anteriormente comentado, que, apesar da glândula perianal ter dependência hormonal, o comportamento de proliferação e morte celular divergia de outros tecidos andrógenos - dependentes.

Explicações sobre a ocorrência do aumento da apoptose durante a carcinogênese da glândula perianal podem ser sugeridas, como as vias de sinalização da relação andrógeno-receptor e via de morte apoptótica intrínseca, acima descrita por Lin et al. (2006), onde andrógenos e seus receptores promoveriam a apoptose mediada por Bax em células positivas para receptores as quais expressam um pequeno RNA de interferência (siRNA); mutação da proteína p53 e sua superexpressão (sabe-se que a proteína p53 está mutada em 50% dos tumores humanos e, também, que elas têm um papel chave na apoptose, no ciclo celular e na expressão de alguns genes). Segundo Lyons et al. (1997), a função da p53 como supressora de tumor, quando de dano do DNA, é por bloqueio do ciclo celular (para o reparo do DNA) ou por apoptose e neste caso ocorria um aumento do Bax, Bid e Bik (proteínas que parecem ter sítios de ligação com p53, induzindo uma maior expressão da p53, diminuição da Bcl2/Bclx e aumento do Fas (CD95) o qual leva ativação da caspase e mesmo por meio de outros mecanismos além destes, mecanismos transcricionais). Entretanto, Nakano, Taura e Inoue (2005), estudaram a relação da expressão de Mdm2 e p 53 em glândulas perianais hiperplásicas e neoplásicas(benignas e malignas) e concluíram sugerindo que o aumento da expressão de Mdm2 encontrado nas hiperplasias e adenomas (neste caso com variações de 4-80%) e ausência de expressão do Mmd2 nos carcinomas, é um evento precoce da tumorigenicidade das glândulas perianais, estando presente mesmo quando há ausência de acúmulo p53 nuclear. O gene Mmd2 está bem documentado como oncogene que pode inibir o p53 e, portanto, claramente tem uma função independente do p53 levando a conseqüências significantes para a sobrevida e divisão celular de células com DNA danificado e por envolvimento em células tumorais (ASAHARA et al., 2001; VLATKOVIC et al., 2000).

A proteína survivina, recentemente descoberta, pertence à família dos genes inibidores de apoptose. A survivina é expressa durante o desenvolvimento embrionário estando ausente na maioria dos tecidos diferenciados. Em muitos tumores, entretanto, está superexpressa. O mecanismo molecular para o bloqueio da apoptose e o motivo de estar super expressa são ainda incógnitas a serem desvendadas (GUAN; CHENG, 2001; JOHNSON; HOWERTH, 2004), mas, eventualmente, na glândula perianal neoplásica esse gene esteja inativado ou mutado, não expressando a survivina.

Dadas as várias possibilidades genéticas, um maior entendimento das expressões de genes e sua relação entre a proliferação celular e apoptose e atividade carcinogênica é necessário, principalmente um mais profundo estudo das neoplasias induzidas androgenicamente, o que poderá vir a ser um instrumento valioso na investigação dos mecanismos da carcinogênese e terapias.

Tanto a proliferação celular como a apoptose em órgãos andrógenos-dependentes são modulados por diferentes fatores e determinantes genéticos, por exemplo, os que codificam enzimas e receptores envolvidos no metabolismo e ação de hormônios esteróides (andrógenos e estrógenos), os quais regulam uma variedade de genes teciduais e células específicas, muitos dos quais associados ao câncer. Entre esses genes estão os das conexinas, uma família de mais ou menos 20 genes que medeiam a formação das junções comunicantes tipo GAP. As junções GAP têm sido descritas como responsáveis pelo crescimento coordenado agindo negativamente ou positivamente para atingir uma taxa de crescimento normal (DAGLI et al., 2004) e, portanto, as JGAP têm um papel importante na regulação da homeostasia tecidual, incluindo a proliferação, diferenciação e apoptose (FISHMAN et al., 1991; GOODENOUGH; GOLIGER; PAUL, 1996; HABERMANN et al., 2002; KUMAR; GILULA, 1996).

Muitos estudos, portanto, têm demonstrado que hormônios como estrogênio, progesterona e hormônios tireoidianos regulam as JGAP e as Cxs (LEFEVRE et al., 1995; STOCK; SIES; STAHL, 1998). No miométrio o estrogênio regula para cima a expressão do RNAm da Cx43 enquanto progesterona antagoniza tal efeito (LYE et al., 1993). O estrogênio também induz a ativação transcricional da Cx 43 (HENDRIX et al., 1995; RISEK et al., 1995). Em 1996, Cyr; Hermo e Laird mostraram, previamente, que o epidídimo de ratos orquiectomizados tinha aumento da expressão de Cx 43 e mudanças regionais na expressão padrão da Cx43, sugerindo que andrógenos regulam a Cx43 naquele órgão. Huynh et al. (2001 a), demonstraram que o gene da Cx43 e, portanto, JGAP, também era regulado por andrógenos. Na próstata a diminuição da Cx43 é mais evidente nos estágios tardios da carcinogênese o que sugere que a diminuição da expressão de Cx43 não é responsável pelo

início da carcinogênese prostática. Esta hipótese é reforçada pelo fato de haver um acentuado aumento na incidência e intensidade da Cx43 na hiperplasia prostática. (HABERMANN et al., 2002).

Por ser uma conexina amplamente distribuída e por não se ter nenhuma referência na literatura e por sabermos que uma diminuição da expressão de Cx 43 tem sido descrita em vários órgãos andrógenos - dependentes, como próstata, epidídimo, testículo durante a carcinogênese (HOSSAIN et al., 1999; HUYNH et al., 2001 a; METHA et al., 1999), interessamo-nos primeiramente investigar a expressão da Cx43 nas glândulas perianais normais, hiperplásicas, neoplásicas benignas e malignas.

O resultado do estudo de nossas amostras pela técnica de western blot e imunoistoquímica foi sincrônico e coerente com os tipos e estágios da carcinogênese da glândula perianal e demonstramos pela primeira vez, que a expressão da Cx 43 é importante para a manutenção da homeostasia da glândula perianal.

Ao observarmos os resultados do imunoblot para Cx43 nos vários tipos celulares da glândula perianal, percebemos que inúmeras bandas de Cx 43 puderam ser observadas.

Crow et al.,1990, Laird, 2005 , Musil e Goodenough, 1990b e 1991e outros pesquisadores demonstraram que a Cx 43 é diferentemente fosforilada durante o ciclo celular em células normais . Dessa forma, a Cx 43 demonstrou inúmeras eletroforéticas isoformas quando analisadas por eletroforese em gel poliacrilamida, incluindo a rápida migração que inclui a forma não fosforizada (P_0) e ao menos 2 formas lentas de migração P_1 e P_2 sendo que estas co-migram com P_0 (se tratadas com fosfatase alcalina) ,e, estes dados sugerem que a fosforilação é primariamente uma modificação covalente (MUSIL; BEYER; GOODENOUGH,1990 a) .

Estes estudos corroboram como nossos achados ao observarmos a fosforilação da Cx43 nos vários tipos celulares normais, hiperplásicos e neoplásicos.

Assim, na glândula perianal normal (H4) há expressão da Cx 43 P_2 , P_1 e P_0 , nas hiperplásicas (H3) a expressão da Cx 43 P_2 estava aumentada em relação à normal , apresentava também P_1 e mais fracamente P_0 (resultados semelhantes ao de HABERMANN et al. (2002), em estudo da Cx 43 em hiperplasia prostática, comentado acima), nos adenomas grupo I, II moderadamente diferenciado a expressão da Cx 43 P_2 era menos intensa em relação a normal e hiperplásica sendo que apresentavam Cx43 P_2, P_1 e uma marcação bem fraca da Cx P_0 , não fosforizada. Nos carcinomas (H5 e H3) do grupo III ,Cx43 P_2 era evidente em ambos Cx43 P_2 , sendo que Cx43 P_1 também foi observada. Lembramos que nesse tumor existiam grandes áreas normais que poderiam ter tido suas proteínas extraídas quando

retiramos amostras para extração das proteínas totais. Nos adenomas do grupo II pouco diferenciado, observamos fraca marcação de Cx43 P₂, P₁ e P₀.

De acordo com Solan e Lampe (2005), a fosforização está implicada com a regulação da comunicação JGAP nos vários estágios do ciclo celular e ciclo de vida da conexina, como tráfego, montagem e desmontagem, degradação, bem como no “gating” dos hemicanais e canais JGAP intactos. Relatos recentes e as últimas informações genômicas demonstraram que a ativação de muitas cinases como proteína cinase A (PKA), proteína cinase C (PKC), p34^{cdc2}/ciclina cinase B, caseína cinase 1, proteína cinase mitógeno ativada (MAP) e cinase pp60^{src} podem levar a fosforilação de 12 das 21 serinas e 2 das 6 tirosinas do domínio carboxi-terminal da Cx43 (LAMPE; LAU, 2004; SOLAN; LAMPE, 2005) e que a ausência da expressão de Cx aumenta a tumorigênese (LAIRD et al., 1999) e está correlacionada com ausência de comunicação célula-célula. A proteína cinase C (PKC) tem recebido atenção porque ativadores da PKC promovem carcinogênese, aumentando a fosforilação da Cx43 e diminuindo a comunicação das JGAP em diferentes tipos celulares (BERTHOUD et al., 2000b, LAMPE; LAU, 2000 a).

Pesquisas demonstraram que tratamentos com promotores tumorais como andrógenos podem diminuir a comunicação das JGAP e alterar a mobilidade Cx43 por fosforilação em resíduos específicos como a Serina 368 (LAMPE et al., 2000 b) e serina 372 (SAEZ et al., 1997, 2003) pela PKC e isozimas PKC específicas.

Pela imunohistoquímica vimos que apesar de estar expressa nas células do grupo II pouco diferenciado, na maioria das células, sua localização era aberrante, permanecendo citoplasmática e na minoria das células dessas neoplasias pouco diferenciadas, a Cx 43 não era expressa. Tal localização sugere que durante a carcinogênese da glândula perianal a perda da expressão das JGAP possa estar ocorrendo em estágios relativamente precoces.

Diversos trabalhos demonstraram que a expressão da Cx estava diminuída ou aberrante em lesões pré-cancerosas (SAITO et al., 1997, 2001). Achados semelhantes aos nossos, com localização aberrantemente localizadas de conexina 43, foi demonstrado por Nishimura et al., 2003 em carcinoma endometrial e, os autores sugeriram, que esta localização anormal, era diretamente ligada à expressão da caderina-E (A caderina-E é uma glicoproteína de 120KD que se localiza na zona aderente das células epiteliais, onde regula a adesão celular homofílica dependente do cálcio). Em geral, a perda de função da caderina-E com conseqüente inibição da adesão celular é um evento genético importante na progressão tumoral, sugerindo que ilhas 5' CpG de metilação são as responsáveis pela perda de expressão da E- caderina e portanto, indiretamente causando supressão das JGAP e, induzindo

assim, a localização aberrante das conexinas nas células cancerosas endometriais nos estágios mais precoces da carcinogênese. Dados mais recentes reforçam a idéia de um possível envolvimento na localização da Cx : por exemplo a indução de alfa catenina favorece a recolocação na membrana plasmática das Cxs em linhagens celulares de câncer prostático humano (GOVINDARAJAN et al.,2002). Pretendemos avaliar a expressão de caderina-E também nos processos patológicos das glândulas perianais de cães.

É interessante notar que a localização citoplasmática das conexinas tem sido associada às regiões invasivas dos carcinomas. Por ex, a Cx 26 e Cx 43 em cânceres induzidos quimicamente na bexiga de ratos (ASAMOTO et al.,1994) ou Cx 43 em hepatocarcinomas humanos e murinos (KRUTOVSKIKH et al., 1994; SAKAMOTO et al., 1992).

A evolução em nosso conhecimento de como a organização da cromatina modula a transcrição dos genes clareou a importância dos mecanismos epigenéticos da iniciação e progressão do câncer. Essas alterações epigenéticas afetam cada etapa da progressão do tumor e, em particular, a hipermetilação das regiões promotoras das ilhas de CpG, estando associada com o inapropriado silêncio transcricional de genes supressores do câncer. A hipermetilação da citosina nas ilhas CpG localizadas nas regiões promotoras dos genes supressores de tumor , é considerada atualmente como importante mecanismo de inativação de genes (JONES; BAYLIN, 2002).

Essa localização citoplasmática ou ausência da Cx 43 nos adenomas do grupo II pouco diferenciado sugerem também semelhança das alterações genômicas do grupo II pouco diferenciado ao carcinoma de glândula perianal grupo III.

Ao observarmos as lâminas com glândula perianal normal, hiperplásica e neoplásica marcadas para Cx 26 por imunoistoquímica, vimos que essa conexina estava presente em algumas células, e, principalmente, com localização citoplasmática nos tecidos normais, hiperplásicos e adenomas do grupo I. Raramente apresentava-se na membrana plasmática e quando presente expressava-se de maneira muito sutil. Nos adenomas do grupo II moderadamente e pouco diferenciado raramente era expressa e, sempre, com localização citoplasmática. Os carcinomas não expressaram a Cx 26. Com os resultados obtidos pelo imunoblot observamos, em todos os tcidos estudados, a expressão do dímero da Cx26 (Peso molecular entre 50 e 60KDa). Tornamos a lembrar que nesse tumor existiam grandes áreas normais que poderiam ter tido suas proteínas extraídas, quando retiramos de forma aleatória, amostras para extração das proteínas totais (HERTZBERG; SKIBBENS, 1984).

O exato mecanismo da habilidade e a finalidade de células perianais normais de acumularem Cx 26 no citoplasma não estão claros. Sabe-se, entretanto, que a localização

citoplasmática de conexina nem sempre está associada a situações anormais e patológicas (MESNIL et al, 2005). Miócitos uterinos tendem a acumular Cx 43 antes do parto (HENDRIX et al., 1995) e, similarmente, o acúmulo citoplasmático de Cx 43 é um processo normal durante a espermatogênese no testículo (ROGER et al., 2004), podendo ter a função de controlar a proliferação e diferenciação dos espermatozoides.

Falk; Kumar; Gilula (1994) estudaram a inserção de várias conexinas na membrana plasmática do RE de células pancreáticas e outras células eucarióticas e a distribuição subcelular foi determinada. No pâncreas, a inserção na membrana de todas as conexinas foi acompanhada por um eficiente processo proteolítico dependente da concentração de microsomos. Conexinas não processadas endogenamente foram detectadas nos microsomos indicando que estes servem como recipientes vivos de conexinas não processadas. Observaram, também, que em células que super expressavam conexinas, quantidades variáveis dos produtos de sua clivagem eram encontradas nas membranas do RE. Consequentemente um fator ou uma condição específica deve ser necessário para impedir o processamento das conexinas que permaneceriam citoplasmáticas, como no caso da glândula perianal canina. Seria interessante saber o motivo da permanência da Cx 26 citoplasmática nas glândulas normais.

Diversos trabalhos têm demonstrado ter o gene da Cx 26 a função de supressor de tumor (METHA et al., 1999; YANO et al., 2001). Cx 26 é estruturalmente a menor Cx, não sendo fosforilada (pelo fato de ter poucos aminoácidos na porção C-terminal após o quarto domínio transmembrana, os quais podem reagir com elementos de sinalização citoplasmáticos) (TRAUB et al., 1989). Pouco se sabe sobre a função molecular da Cx26, apenas que não tem a seqüência consensual para cinases nem é fosforilada pela proteína cinase A, proteína cinase C ou pelo cálcio/proteína cinase calmodulina dependente (BRUZZONE; WHITE; PAUL, 1996). Tanaka e Grossman (2004), demonstraram que a expressão forçada de Cx 26 com o uso de vetor adenovírus Cx 26, em câncer de próstata, induzia acúmulo de células na fase G2/M do ciclo celular, apoptose e diminuição da expressão de Bcl-2. Pretendemos em futuro próximo estudar e correlacionar a expressão citoplasmática da Cx 26 nas glândulas perianais normais e o gene Bcl2 e Bax a fim de correlacionar a função fisiológica da Cx 26 e a modulação da apoptose.

A expressão da Cx 32 não foi observada nas lâminas com cortes de tecido normal, hiperplásico, neoplásicos do grupo I, II (moderadamente e pouco diferenciado) e grupo III de glândula perianal canino pelo método imunoistoquímico ou imunoblot.

Em suma, estes resultados indicam que as expressões das Cx 43 e 26 são importantes para a manutenção da homeostasia da glândula perianal canina, e, sugerem fortemente, que estando a glândula perianal também sob influência de andrógenos, e que como os receptores androgênicos não se perdem durante a progressão tumoral (PISANI et al., 2006), os andrógenos também regulariam a expressão da Cx 43, Cx26 e, ainda, que nas células da glândula perianal normais as diferentes conexinas têm funções fisiológicas diferentes e o rompimento das JGAP *per se*, não altera as taxas de proliferação e apoptose, mas exige um estímulo adicional e esse estímulo pode advir da ativação de um oncogene celular ou inativação de um supressor de tumor, nas células iniciadas ou pré-neoplásicas.

Demonstramos, portanto, pela primeira vez, apoptose e sua influência na fase promocional da carcinogênese e, este foi, também, o primeiro estudo demonstrando as alterações na expressão ou localização das conexinas em processos normais e patológicos das glândulas perianais de cães.

Esperamos desta forma, ter contribuído para o conhecimento dos processos normais e patológicos das glândulas perianais de cães, visando não somente o diagnóstico, como também seu prognóstico e tratamento.

7. CONCLUSÕES

A análise dos resultados permitiu-nos as seguintes conclusões:

1. Há evidências da expressão da Cx 43 e 26 em nível citoplasmático e ausência da Cx 32 na glândula normal, hiperplásica , grupo I e II e ausência nos carcinomas das Cxs consideradas.
2. Apoptose aumenta durante o processo de carcinogênese nas glândulas perianais, comportamento que difere dos tecidos andrógenos dependentes estudados.
3. A análise do ICA evidencia que hiperplasia e carcinoma de glândula perianal tem um maior nível de proliferação, mas os adenomas têm um potencial de crescimento maior, levando-se em conta a apoptose.
4. Da análise comparativa e crítica da classificação da OMS e Berrocall sugerimos a utilização da classificação de Berrocall principalmente para prognóstico.
5. Não se observou diferença na frequência de ocorrência em hiperplasia e neoplasia de glândula perianal em relação a sexo e idade em relação à literatura.
6. Não se observou diferença na proliferação das células neoplásicas da glândula perianal em relação à literatura.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Molecular biology of the cell. Publishe by **Garland. Publishing**, New York, NY: United States of America, 1994.1294 p.
- ASAHARA, T.; YANO, M.; KATAYAMA, K.; ITAMOTO, T. Alterations of mismatch repair gene in hepatocellular carcinoma. **Nippon Rinsho**. v. 59, n. 6, p. 157-160, 2001
- ASAMOTO, M.; TAKAHASHI, S.; IMAIDA, K.; SHIRAI, T; FUKUSHIMA, S. Increased gap junctional intercellular communication capacity and connexin 43 and 26 expression in rat bladder carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 10, p. 2163-2166, 1994.
- BENNETT, M. V.; BARRIO, L. C.; BARGIELLO, T. A.; SPRAY, D. C.; HERTZBERG, E.; SAEZ J.C. Gap junctions: new tools, new answers, new questions. **Neuron.**, v. 6, n. 3, p. 305-320, 1991.
- BENNETT, P. F.; DENICOLA, D. B.; BONNEY, P.; GLICKMAN, N. W.; KNAPP, D. W. Canine anal sac adenocarcinomas: clinical presentation and response to therapy. **J Vet Intern Med.**, v. 16, n. 1, p. 100-104, 2002.
- BERROCAL, A.; VOS, J. H.; VAN DEN INGH, T. S.; MOLENBEEK, R. F.; VAN SLUIJS, F. J. Canine perineal tumours. **Zentralbl Veterinarmed A.**, v. 36, n. 10, p. 739-749, 1989.
- BERTHOUD, V.M.; BEYER, E.C.; KURATA, W.E.; LAU, A.F.; LAMPE, P.D. The gap-junction protein connexin 56 is phosphorylated in the intracellular loop and the carboxy-terminal region. **Eur J Biochem.**, v. 244, n.1, p.89-97, 1997.
- BERTHOUD, V. M.; MONTEGNA, E. A.; ATAL, N.; AITHAL, N. H.; BRINK, P. R. ; BEYER, E. C. Heteromeric connexons formed by lens connexins, connexin43 and connexin 56 **Eur.J. Cell Biol.**, v. 80, p. 11-19, 2000 a
- BERTHOUD, V. M.; WESTPHALE, E. M.; GRIGORYEVA, A.; BEYER, E. C. PKC isoenzymes in the chicken lens and TPA-induced effects on intercellular communication. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 41, n. 3, p. 850-858, 2000 b.
- BEVANS, C. G.; KORDEL, M.; RHEE, S. K.; HARRIS, A. L. Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. **J Biol Chem.**, v. 273, n. 5, p. 2808-2816, 1998.
- BEYER, E. C. Gap junctions. **Int Rev Cytol.**, v. 137, p. 1-37, 1993.
- BEYER, E. C.; PAUL, D. L.; GOODENOUGH, D. A. Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. **J Cell Biol.**, v. 105, n.6, p. 2621-2629, 1987.
- BLAZQUEZ, N. B.; FRENCH, J. M.; LONG, S. E.; PERRY, G. C. A pheromonal function for the perineal skin glands in the cow. **Vet Rec.**, v. 123, n. 2, p. 49-50, 1988.
- BRAVO, R.; MACDONALD BRAVO, H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. **J. Cell Biol.**, v. 105, p. 1549-1554, 1987.
- BRINK, P. R.; CRONIN, K.; BANACH, K.; PETERSON, E.; WESTPHALE, E. M.; SEUL, K. H.; RAMANAN, S. V; BEYER, E. C. Evidence for heteromeric gap junction channels formed from rat connexin43 and human connexin37. **Am J Physiol.**, v. 273, n. 4, p. 1386-1396, 1997.

BRUZZONE, R.; WHITE, T. W.; PAUL, D. L. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. **Eur J Biochem.**, n. 238, n. 1, p.1-27, 1996.

BURSCH, W.; GRASL-KRAUP, P.; ELLINGER, A.; TOROK, L.; KIENZI, H.; MULLAUER, L.; SCHULE-HERMANN, R. Active cell death: role in hepatocarcinogenesis and subtypes. **Biochem Cell Biol.**, v. 72, p. 669-675, 1994.

CASASCO, A.; GIORDANO, M.; DANOVA, M.; CASASCO, M.; ICARO CORNAGLIA, A.; CALLIGARO, A. PC10 monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen as probe for cycling cell detection in developing tissues. A combined immunocytochemical and flow cytometric study. **Histochemistry**, v. 99, n. 3, p. 191-199, 1993.

CASTAGNARO, M.; NEGRO, M.; VALENZA, F. Glycoconjugate expression in normal hepatoid glands and hepatoid gland adenomas and carcinomas in dogs. **Res Vet Sci.**, v. 49, n. 3, p. 275-278, 1990.

CHARLES, A. C.; NAUS, C. C.; ZHU, D.; KIDDER, G. M.; DIRKSEN, E. R.; SANDERSON, M. J. Intercellular calcium signaling via gap junctions in glioma cells. **J Cell Biol.**, v. 118, n.1, p. 195-201, 1992.

CHODAK, G. W. ; KRANC, D. M. ; PUY, L. A. ; TAKEDA, H.; JOHNSON, K.; CHANG, C. Nuclear localization of androgen receptor in heterogeneous samples of normal, hyperplastic and neoplastic human prostate. **J Urol.**, v. 147, n.3, p. 798-803, 1992.

COCHAND-PRIOLETT, B.; RAISON, D.; MOLINIE, V.; GUILLAUSSÉAU, P. J.; WASSE, F. M.; BOUCHAUD, C. Altered gap and tight junctions in human thyroid oncocyctic tumors: a study of 8 cases by freeze-fracture. **Ultrastruct Pathol.**, v. 22, n. 6, p. 413-420, 1998.

CONDORELLI, D. F.; PARENTI, R.; SPINELLA, F.; TROVATO SALINARO, A.; BELLUARDO, N.; CARDILE, V.; CICIRATA, F. Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. **Eur J Neurosci.**, v. 10, n. 3, p.1202-1208, 1998.

COTTRELL, G. T.; BURT, J. M. Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1711, n. 2, p. 126-141, 2005.

CROW, D. S.; BEYER, E. C.; PAUL, D. L.; KOBE, S. S.; LAU, A. F. Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and Rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblasts. **Mol Cell Biol.**, v. 10, n. 4, p. 1754-1763, 1990.

CULIG, Z.; HOBISCH, A.; BARTSCH, G.; KLOCKER, H. Androgen receptor an update of mechanism of action in prostate cancer. **Urol Res.**, v. 28, n.4, p. 211-219, 2000.

CYR, G. D.; HERMO, L.; LAIRD, D. W. Immunocytochemical localization and regulation of connexin 43 in the adult rat epididymis. **Endocrinology**, v. 137, n. 3, p. 1474-1484, 1996.

DAGLI, M. L.; YAMASAKI, H.; KRUTOVSKIKH, V.; OMORI, Y. Delayed liver regeneration and increased susceptibility to chemical hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing a dominant-negative mutant of connexin32 only in the liver. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 4, p. 483-492, 2004.

DAHL, G.; WERNER, R.; LEVINE, E.; RABADAN-DIEHL, C. Effect of the substrate on neurofilament phosphorylation in mixed cultures of rat embryo spinal cord and dorsal root ganglia. **Int J Dev Neurosci.**, v. 10, n. 2, p. 111-119, 1992.

- DARROW, B. J.; LAING, J. G.; LAMPE, P. D.; SAFFITZ, J. E.; BEYER, E. C. Expression of multiple connexins in cultured neonatal rat ventricular myocytes. **Circ Res.**, v. 76, n. 3, p. 381-387, 1995.
- DAVIES, T. C.; BARR, K. J.; JONES, D. H.; ZHU, D.; KIDDER, G. M. Multiple members of the connexin gene family participate in preimplantation development of the mouse. **Dev Genet.**, v. 18, n. 3, p. 234-243, 1996.
- DIEZ, J. A.; AHMAD, S.; EVANS, W. H. Assembly of heteromeric connexons in guinea-pig liver en route to the Golgi apparatus, plasma membrane and gap junctions. **Eur J Biochem.**, v. 262, n. 1, p. 142-148, 1999.
- DOW, S. W.; OLSON, P. N.; ROSYCHUK, R. A.; WITHROW, S. J. Perianal adenomas and hypertestosteronemia in a spayed bitch with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. **J Am Vet Med Assoc.**, v.192, n. 10, p.1439-1441, 1988.
- DUBINA, M. V.; IATCKII, N. A.; POPOV, D. E.; VASIL'EV, S. V.; KRUTOVSKIKH, V. A. Connexin 43, but not connexin 32, is mutated at advanced stages of human sporadic colon cancer. **Oncogene**, v. 21, n. 32, p. 4992-4996, 2002.
- DUFLOT-DANCER A; MESNIL M; YAMASAKI H. Dominant-negative abrogation of connexin-mediated cell growth control by mutant connexin genes. **Oncogene**, v. 15, n. 18, p. 2151-2158, 1997.
- DUGA, S.; ASSELTA, R.; DEL GIACCO, L.; MALCOVATI, M.; RONCHI, S.; TENCHINI, M. L.; SIMONIC, T. A new exon in the 5' untranslated region of the connexin 32 gene. **Eur J Biochem.**, v. 259, n. (1-4), p. 188-196, 1999.
- DUPONT, E.; EL AOUMARI, A.; BRIAND, J. P.; FROMAGET, C.; GROS, D. Cross-linking of cardiac gap junction connexons by thiol/disulfide exchanges. **J Membr Biol.**, v. 108, n. 3, p. 247-252, 1989.
- EGHBALI, B.; KESSLER, J. A.; REID, L. M.; ROY, C.; SPRAY, D. C. Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfection of tumor cells with connexin 32 cDNA retards growth in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.88, n. 23, p. 10701-10705, 1991.
- EGHBALI, B.; KESSLER, J. A.; SPRAY, D. C. Expression of gap junction channels in communication-incompetent cells after stable transfection with cDNA encoding connexin 32. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 87, n. 4, p. 1328-1331, 1990.
- ERKKILA, K.; HENRIKSEN, K.; HIRVONEN, V.; RANNIKKO, S.; SALO, J.; PARVINEN M.; DUNKEL, L. Testosterone Regulates Apoptosis in Adult Human Seminiferous Tubules in Vitro. **J. Clin. Endocr. & Metab.**, v. 82, n. 7, p. 2314-2321, 1997.
- ESPLIN, D. G.; WILSON, S. R.; HULLINGER, G. A. Squamous cell carcinoma of the anal sac in five dogs. **Vet Pathol.**,v. 40, n. 3, p.332-334, 2003.
- EVANS, C. R.; PIERREPOINT, C. G. Tissue-steroid interactions in canine hormone-dependent tumours. **Vet Rec.**, v. 97, n. 24, p.464-467, 1975.
- EVANS, H. E.; HOWARD, E. E.; SUSAN, A. In: Evans Miller's anatomy of the dog. , Evans H. E. **Miller's anatomy of the dog**. 3 ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1993, p.
- FALK, M. M. Connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells. **J Cell Sci.**, v. 113, n. 22, p. 4109-4120, 2000.

- FALK, M. M.; BUEHLER, L. K.; KUMAR, N. M.; GILULA, N. B. Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels. **EMBO J.**, v. 16, n. 10, p. 2703-2716, 1997.
- FALK, M. M.; GILULA, N. B. Connexin membrane protein biosynthesis is influenced by polypeptide positioning within the translocon and signal peptidase access. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 14, p. 7856-7864, 1998.
- FALK, M. M.; KUMAR, N. M.; GILULA, N. B. Membrane insertion of gap junction connexins: polytopic channel forming membrane proteins **J Cell Biol.**, v. 127, n. 2, p. 343-355, 1994.
- FISHMAN, G. I.; MORENO, A. P.; SPRAY, D. C.; LEINWAND, L. A. Functional analysis of human cardiac gap junction channel mutants. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, n.9, p.3525-3529, 1991.
- FLADMARK, K. E.; GJERTSEN, B. T.; MOLVEN, A.; MELLGREN, G.; VINTERMYR, O. K.; DOSKELAND, S. O. Gap junctions and growth control in liver regeneration and in isolated rat hepatocytes. **Hepatology**, v. 25, n. 4, p. 847-855, 1997.
- FLEISHMAN, S. J.; UNGER, V. M.; YEAGER, M.; BEN-TAL, N. A. Calpha model for the transmembrane alpha helices of gap junction intercellular channels. **Mol Cell**, v. 15, n. 6, p. 879-888, 2004.
- FOOTE, C. I.; ZHOU, L.; ZHU, X.; NICHOLSON, B. J. The pattern of disulfide linkages in the extracellular loop regions of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions. **J Cell Biol.**, v. 140, n. 5, p. 1187-97, 1998.
- FUJIMOTO, K.; NAGAFUCHI, A.; TSUKITA, S.; KURAOKA, A.; OHOKUMA, A.; SHIBATA, Y. Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. **J Cell Sci.**, v.110, n. 3, p.311-322, 1997.
- GENEVOIS, J. P. Pathologie ano retale e perineale .I.Circumnalomes. **Revue.Med.Vet.**, v. 131, p. 697-705, 1980.
- GEORGE, C. H.; KENDALL, J. M.; EVANS, W. H. Intracellular trafficking pathways in the assembly of connexins into gap junctions. **J Biol. Chem.**, v. 274, n. 1, p.8678-8685, 1999.
- GHOSHROY, S.; GOODENOUGH, D. A.; SOSINSKY, G. E. Preparation, characterization, and structure of half gap junctional layers split with urea and EGTA. **J Membr Biol.**, v. 146, n. 1, p. 15-28, 1995.
- GOLDSCHMIDT, M. H.; DUNSTAN, R. W.; STANNARD, A. A. A; VON TSCAENER, C.; WALDE, E. J.; YAGER, J. A. **Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of skin of domestic animals**. Washington, Armed Forces, Institute of Pathology, 1998, v. 3, p.(second series).
- GOLDSCHMIDT, M. H.; ZOLTOWSKI, C. Anal sac gland adenocarcinoma in the dog: 14 cases. **J Small Anim Pract.**, v. 22, n. 3 ,p. 119-128 , 1981.
- GOODENOUGH, D.A.; DICK J.S.; LYONS, J.E. Lens metabolic cooperation: a study of mouse lens transport and permeability visualized with freeze-substitution autoradiography and electron microscopy. **J Cell Biol**, v. 86, n. 2, p. 576-589, 1980.
- GOODENOUGH, D. A.; GOLIGER, J. A.; PAUL, D. L. Connexins, connexons and intercellular connection. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 475-502, 1996.

- GOODENOUGH, D. A.; STOECKENIUS, W. The isolation of mouse hepatocyte gap junctions. Preliminary chemical characterization and x-ray diffraction. **J Cell Biol.**, v. 54, n. 3, p. 646-656, 1972.
- GOURLEY, I. M.; GREGORY, C. R. **Atlas of small animal surgery**. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1992. , cap 15, p.155-156.
- GOVINDARAJAN, R.; ZHAO, S.; SONG, X. H.; GUO, R. J.; WHEELLOCK, M.; JOHNSON, K. R.; MEHTA, P. P. Impaired trafficking of connexins in androgen-independent human prostate cancer cell lines and its mitigation by alpha-catenin. **J Biol Chem.**, v. 277, n. 51, p. 50087-50097, 2002.
- GREEN, C. R. Evidence mounts for the role of gap junctions during development. **Bioessays**, v. 8, p. 7-10, 1988.
- GUAN, J.; CHEN, J. Survivin --a new tumor-specific anti-apoptosis factor. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao**, v.23, n. 5, p.532-534, 2001.
- GUERRIER, A.; FONLUPT, P.; MORAND, I.; RABILLOUD, R.; AUDEBET, C.; KRUTOVSKIKH, V.; GROS, D.; ROUSSET, B.; MUNARI-SILEM, Y. Gap junctions and cell polarity: connexin32 and connexin43 expressed in polarized thyroid epithelial cells assemble into separate gap junctions, which are located in distinct regions of the lateral plasma membrane domain. **J Cell Sci.**, v. 108, n. 7, p. 2609-2617, 1995.
- HABERMANN, H.; RAY, V.; HABERMANN, W.; PRINS, G.S. Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **J Urol.**, v. 166, n. 6, p. 2267-2272, 2001.
- HABERMANN, H.; RAY, V.; HABERMANN, W.; PRINS, G. S. Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **J Urol.**, v. 167, n. 2, p. 655-660, 2002.
- HAUBRICH, S.; SCHWARZ, H. J.; BUKAUSKAS, F.; LICHTENBERG-FRATE, H.; TRAUB, O.; WEINGART, R.; WILLECKE, K. Incompatibility of connexin 40 and 43. Hemichannels in gap junctions between mammalian cells is determined by intracellular domains. **Mol Biol Cell**, v. 7, n. 12, p. 1995-2006, 1996.
- HAYES JR, H. M.; WILSON, G. P. Hormone-dependent neoplasm of the canine perianal gland. **Cancer Research**, v.37, n. 7, p. 2068-2071, 1977.
- HE, D. S.; JIANG, J. X.; TAFFET, S. M.; BURT, J. M. Formation of heteromeric gap junction channels by connexins 40 and 43 in vascular smooth muscle cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 96, n.11, p. 6495-6500, 1999.
- HELLMANN, P.; GRUMMER, R.; SCHIRRMACHER, K; ROOK, M; TRAUB, O; WINTERHAGER, E. Transfection with different connexin genes alters growth and differentiation of human choriocarcinoma cells. **Exp Cell Res.**, v. 246, n.2, p.480-490, 1999.
- HENDRIX, E. M.; MYATT, L.; SELLERS, S.; RUSSELL, P. T.; LARSEN, W. J. Steroid hormone regulation of rat myometrial gap junction formation: effects on cx43 levels and trafficking. **Biol Reprod.**, v. 52, n. 3, p. 547-560, 1995.
- HENNEMANN, H.; DAHL, E.; WHITE, J. B.; SCHWARZ, H. J.; LALLEY, P. A.; CHANG, S.; NICHOLSON, B. J.; WILLECKE, K. Two gap junction genes, connexin 31.1 and 30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expressed in skin. **J Biol Chem.**, v. 267, n. 24, p. 17225-17233, 1992.

- HERTZBERG, E., SKIBBENS, R. V. A protein homologous to the 27,000 dalton liver gap junction protein is present in a wide variety of species and tissues. **Cell**, v. 39, n. 1, p.61-69,1984.
- HIGGINS, D. G.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. **Methods Enzymol.**, v. 266, p.383-402, 1996.
- HOLT P. Anal and perianal surgery in dogs and cats. **In Pract.**, v. 7, n. 3, p. 82-89, 1985.
- HOSSAIN, M. Z.; JAGDALE, A. B.; AO, P.; LECIEL, C.; HUANG, R. P.; BOYNTON, A. L. Impaired expression and posttranslational processing of connexin43 and downregulation of gap junctional communication in neoplastic human prostate cells. **Prostate**, v. 38, n. 1, p. 55-59, 1999.
- HUYNH, H. T.; ALPERT, L.; LAIRD, D. W.; BATIST, G.; CHALIFOUR, L.; ALAOUJ-JAMALI, M. A. Regulation of the gap junction connexin 43 gene by androgens in the prostate. **J Mol. Endocrinol.**, v. 26, n. 1, p. 1-10, 2001a.
- HUYNH, H.; ALPERT, L.; ALAOUJ-JAMALI, M. A.; NG, C. Y.; CHAN, T. W. Co-administration of finasteride and the pure anti-oestrogen ICI 182,780 act synergistically in modulating the IGF system in rat prostate. **J Endocrinol.**, v. 171, n. 1, p. 109-118, 2001b.
- ISAACS, J. T. Role of programmed cell death in carcinogenesis. **Environ. Health Perspect.**, v.5, n. 101, p. 27-33, 1993.
- JIANG, J. X.; PAUL, D. L.; GOODENOUGH, D. A. Posttranslational phosphorylation of lens fiber connexin46: a slow occurrence. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 34, n. 13, p. 3558-3565, 1993.
- JOHNSON, M. E.; HOWERTH E. W. Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. **Vet. Pathol.**, v. 41, n. 6, p. 599-607, 2004.
- JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet.**, v. 3, n. 6, p. 415-428, 2002.
- KANNO, Y.; LOEWENSTEIN, W.R. Cell-to-cell passage of large molecules. **Nature**, v. 212, n. 62, p. 629-30, 1966.
- KASTEN, M. M.; GIORDANO, A. pRb and the cdks in apoptosis and the cell cycle. **Cell Death Differ.**, v.5, n. 2, p. 132-140, 1998.
- KIANG, D. T. ; FUKUSHIMA, L. H.; HIEBER, A. D.; SHIMABUKURO, K. A.; SAKR, W. A.; BERTRAM, J. S. Reduced levels of connexin 43 in cervical dysplasia inducible expression in a cervical carcinoma cell line decreases neoplastic potential with implications for tumor progression. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 6, p.1097-1109, 2000.
- KIKUCHI, A.; NISHIKAWA, T. Apoptotic and proliferating cells in cutaneous lymphoproliferative diseases. **Arch. Dermatol.** , v. 133, n. 7, p. 829-833, 1997.
- KING, K. L.; CIDLOWSKI, J. A. Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. **J Cell Biochem.**, v. 58, n. 2, p. 175-180, 1995.
- KING, T. J.; FUKUSHIMA, L. H.; HIEBER, A. D.; SHIMABUKURO, K. A.; SAKR, W. A.; BERTRAM, J. S. Reduced levels of connexin43 in cervical dysplasia: inducible expression in a cervical carcinoma cell line decreases neoplastic potential with implications for tumor progression. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 6, p. 1097-1109, 2000.

- KOJIMA, T.; SAWADA, N.; OYAMADA, M.; CHIBA, H.; ISOMURA, H.; MORI, M. Rapid appearance of connexin 26-positive gap junctions in centrilobular hepatocytes without induction of mRNA and protein synthesis in isolated perfused liver of female rat. **J Cell Sci.**, v. 107, p. 3579-3590, 1994a. Pt. 12.
- KOJIMA, T.; SAWADA, N.; ZHONG, Y.; OYAMADA, M.; MORI, M. Sequential changes in intercellular junctions between hepatocytes during the course of acute liver injury and restoration after thioacetamide treatment. **Virchows Arch.**, v. 425, n. 4, p. 407-412, 1994b.
- KOLAJA, K. L.; ENGELKEN, D. T.; KLAASSEN, C.D. Inhibition of gap-junctional-intercellular communication in intact rat liver by nongenotoxic hepatocarcinogens. **Toxicology**, v. 146, n. 1, p. 15-22, 2000a.
- KOLAJA, K. L.; PETRICK, J. S.; KLAASSEN, C. D. Inhibition of gap-junctional-intercellular communication in thyroid-follicular cells by propylthiouracil and low iodine diet. **Toxicology**, v. 143, n. 2, p.195-202, 2000b.
- KONG, J; RINGER, D. P. Quantitative analysis of changes in cell proliferation and apoptosis during preneoplastic and neoplastic stages of hepatocarcinogenesis in rat. **Cancer Lett.**, v. 105, n. 2, p. 241-248, 1996.
- KONG, J.; RINGER, D. P. Quantitative in situ image analysis of apoptosis in well and poorly differentiated tumors from rat liver. **Am J Pathol.** v. 147, n. 6, p. 1626-1632, 1995.
- KOVAL, M. Pathways and control of connexin oligomerization. **Trends Cell Biol.**, v. 16, n. 3, p. 159-166, 2006.
- KRUTOVSKIKH, V.; MAZZOLENI, G.; MIRONOV, N.; OMORI, Y.; AGUELON, A. M.; MESNIL, M.; BERGER, F.; PARTENSKY, C.; YAMASAKI, H. Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin 32. **Int J Cancer**, v.56, n. 1, p. 87-94, 1994.
- KRUTOVSKIKH, V. A.; OYAMADA, M.; YAMASAKI, H. Sequential changes of gap-junctional intercellular communications during multistage rat liver carcinogenesis: direct measurement of communication in vivo. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 9, p. 1701-1706, 1991.
- KUMAR, N. M.; GILULA, N. B. Molecular biology and genetics of gap junction channels. **Semin Cell Biol.**, v. 3, n. 1, p. 3-16, 1992.
- KUMAR, N. M.; GILULA, N. B. The gap junction communication channel. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 381-388, 1996.
- LAING, J. G.; BEYER, E. C. The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. **J Biol Chem.**, v. 270, n. 44, p. 26399-26403, 1995.
- LAIRD, D. W. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1711, n. 2, p. 172-182, 2005.
- LAIRD, D. W.; FISTOURIS, P.; BATIST, G.; ALPERT, L.; HUYNH, H. T.; CARYSTINOS, G. D.; ALAOUI-JAMALI, M. A. Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. **Cancer Res.**, v.59, n. 16, p. 4104-4110, 1999.

- LAMPE, P. D.; KURATA, W. E.; WARN-CRAMER, B. J.; LAU, A. F. Formation of a distinct connexin 43 phosphoisoform in mitotic cells is dependent upon p34cdc2 kinase. **J Cell Sci.**, v.111, p. 833-841, 1998. Pt 6.
- LAMPE, P. D.; LAU, A. F. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. **Arch Biochem Biophys.**, v. 384, n. 2, p. 205-215, 2000a.
- LAMPE, P. D.; LAU, A. F. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 36, n. 7, p. 1171-1186, 2004.
- LAMPE, P. D.; TENBROEK, E. M.; BURT, J. M.; KURATA, W. E.; JOHNSON, R. G.; LAU, A. F. Phosphorylation of connexin 43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. **J Cell Biol.**, v. 149, n. 7, p. 1503-1512, 2000b.
- LANG, L. M.; BEYER, E. C.; SCHWARTZ, A. L.; GITLIN, J. D. Molecular cloning of a rat uterine gap junction protein and analysis of gene expression during gestation. **Am J Physiol.**, v. 260, n. 5, p. 787-793, 1991. Pt 1.
- LARSEN, W. J.; TUNG, H. N.; MURRAY, S. A.; SWENSON, C. A. Evidence for the participation of actin microfilaments and bristle coats in the internalization of gap junction membrane. **J Cell Biol.**, v. 83, n. 3, p. 576-587, 1979.
- LEE, S. W.; TOMASETTO, C.; PAUL, D.; KEYOMARSI, K.; SAGER, R. Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. **J Cell Biol.**, v. 118, n. 5, p. 1213-1221, 1992.
- LEE, S. W.; TOMASETTO, C.; SAGER, R. Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 88, n. 7, p. 2825-2829, 1991.
- LEFEVRE, D. L.; PIERSANTI, M.; BAI, X. H.; CHEN, Z. Q.; LYE, S. J. Myometrial transcriptional regulation of the gap junction gene, connexin-43. **Reprod Fertil Dev**; v. 7, n. 3, p. 603-611, 1995.
- LIN Y.; KOKONTIS J.; TANG, F.; GODFREY, B.; LIAO, S.; LIN, A.; CHEN, Y.; XIANG, J. Androgen and its receptor promote Bax-mediated apoptosis. **Mol Cell Biol.**, v. 26, n. 5, p. 1908-1916, 2006.
- LINDEN, M. D.; TORRES, F. X.; KUBUS, J.; ZARBO, R. J. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. **Am J Clin Pathol.**, v. 97, n. 5, p. 4-13, 1992. Supplement 1.
- LIU, S.; TAFFET, S.; STONER, L.; DELMAR, M.; VALLANO, M. L.; JALIFE, J. A structural basis for the unequal sensitivity of the major cardiac and liver gap junctions to intracellular acidification: the carboxyl tail length. **Biophys. J.**, v. 64, n. 5, p. 1422-1433, 1993.
- LO, C. W. The role of gap junction membrane channels in development. **J Bioenerg Biomembr.**, v. 28, n. 4, p. 379-385, 1996.
- LOEWENSTEIN, W. R.; KANNO, Y. Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. **Nature**, v. 209, n. 29, p. 1248-1249, 1966.
- LYE, S. J.; NICHOLSON, B. J.; MASCARENHAS, M.; MACKENZIE, L.; PETROCELLI, T. Increased expression of connexin-43 in the rat myometrium during labor is associated with an increase in the plasma estrogen:progesterone ratio. **Endocrinology**, v. 132, n. 6, p.2380-2386, 1993.

- LYONS, S. K.; CLARKE, A. R. Apoptosis and carcinogenesis. **Br Med Bull.**, v. 53, n. 3, p.554-569, 1997.
- MAKOWSKI, L.; CASPAR, D. L.; PHILLIPS, W. C.; GOODENOUGH, D. A. Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. **J Cell Biol.**, v. 74, n. 2, p. 629-645, 1977.
- MARCHEVSKY, R. S.; CHQUILOFF, M. A. G.; NASCIMENTO, E. F.; NOGUEIRA, R. H. G. Neoplasias cutâneas em cães. Belo Horizonte, **Arq. Esc. Vet. UFMG.**, v. 32, n. 1, p. 30-35, 1980.
- MEHTA, P. P.; PEREZ-STABLE, C.; NADJI, M.; MIAN, M.; ASOTRA, K; ROOS, B. A. Suppression of human prostate cancer cell growth by forced expression of connexin genes. **Dev Genet.**, v. 24, n. 1-2, p. 91-110, 1999.
- MESNIL, M.; CRESPI, S.; AVANZO, J. L.; ZAIDAN-DAGLI, M. L. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1719, n. 1-2, p. 125-145, 2005.
- MESNIL, M.; KRUTOVSKIKH, V.; OMORI, Y.; YAMASAKI H. Role of blocked gap junctional intercellular communication in non-genotoxic carcinogenesis. **Toxicol Lett.**, v. 82-83, p.701-706, 1995.
- MESNIL, M.; YAMASAKI, H. Role of junctional intercellular communication in hepatic carcinogenesis in rats. **Bull Cancer**,v. 77, n. 5,p.485-488, 1990.
- MEUTEN, D. J.; COOPER, B. J.; CAPEN, C. C.; CHEW, D. J.; KOCIBA, G. J. Hypercalcemia associated with an adenocarcinoma derived from the apocrine glands of the anal sac. **Vet Pathol.**, v. 18, n. 4, p. 454-71, 1981.
- MEUTEN, D. J. ; SEGRE, G. V.; CAPEN, C. C.; KOCIBA ,G. J.; VOELKEL, E. F.; LEVINE, L.; TASHJIAN, A. H.; CHEW, D. J., NAGODE, L. A. Hypercalcemia in dogs with adenocarcinoma derived from apocrine glands of anal sac. **Lab. Inves.**, v. 48, n. 4, p. 428-435, 1983.
- MONAGHAN, P.; PERUSINGHE, N.; CARLILE, G.; EVANS, W. H. Rapid modulation of gap junction expression in mouse mammary gland during pregnancy, lactation, and involution. **J Histochem Cytochem.**, v. 42, n. 7, p. 931-938, 1994.
- MOORBY, C.; PATEL, M. Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. **Exp Cell Res.**, v. 271, n. 2, p. 238-248, 2001.
- MUNARI-SILEM, Y.; LEBRETHON, M. C.; MORAND, I.; ROUSSET, B.; SAEZ, J. M. Gap junction-mediated cell-to-cell communication in bovine and human adrenal cells. A process whereby cells increase their responsiveness to physiological corticotropin concentrations. **J Clin Invest.**, v. 95, n. 4, p. 1429-1439, 1995.
- MUSIL, L. S.; BEYER, E. C.; GOODENOUGH, D. A. Expression of the gap junction protein connexin43 in embryonic chick lens: molecular cloning, ultrastructural localization, and post-translational phosphorylation. **J Membr Biol.**, v. 116, n. 2, p. 163-175, 1990a.
- MUSIL, L. S.; GOODENOUGH, D. A. Biochemical analysis of connexin 43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. **J Cell Biol.**, v. 115, n. 5, p. 1357-1374, 1991
- MUSIL, L. S.; GOODENOUGH, D. A. Gap junctional intercellular communication and the regulation of connexin expression and function. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 2, n. 5, p. 875-880, 1990b.

- MUSIL, L. S.; GOODENOUGH, D. A. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin 43, occurs after exit from the ER. **Cell**, v. 74, n. 6, p. 1065-1077, 1993.
- NAKANO, M.; TAURA, Y.; INOUE, M. Protein expression of Mdm2 and p53 in hyperplastic and neoplastic lesions of the canine circumanal gland. **J Comp Pathol.**, v. 132, n. 1, p. 27-32, 2005.
- NAUS, C. C.; HEARN, S.; ZHU, D.; NICHOLSON, B. J.; SHIVERS, R. R. Alterations in the synthesis of insulin-like growth factor binding proteins and insulin-like growth factors in rat C6 glioma cells transfected with a gap junction connexin 43 cDNA. **Regul Pept.**, v.48, n. 1-2, p. 99-112, 1993.
- NEI, H.; SAITO, T.; YAMASAKI, H.; MIZUMOTO, H.; ITO, E.; KUDO, R. Nuclear localization of beta-catenin in normal and carcinogenic endometrium. **Mol Carcinog.**, v. 25, n. 3, p. 207-218, 1999.
- NEUHAUS, I. M.; BONE, L.; WANG, S.; IONASESCU, V.; WERNER, R. The human connexin 32 gene is transcribed from two tissue-specific promoters. **Biosci Rep.**, v. 16, n. 3, p. 239-248, 1996.
- NEVEU, M. J.; HULLY, J. R.; PAUL, D. L.; PITOT, H. C. Reversible alteration in the expression of the gap junctional protein connexin 32 during tumor promotion in rat liver and its role during cell proliferation. **Cancer Commun.**, v. 2, n. 1, p. 21-31, 1990.
- NICHOLSON, B. J.; HUNKAPILLER, M. W.; GRIM, L. B.; HOOD, L. E.; REVEL, J. P. Rat liver gap junction protein: properties and partial sequence. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 78, n. 12, p. 7594-7598, 1981.
- NICHOLSON, B. J.; WEBER, P. A.; CAO, F.; CHANG, H.; LAMPE, P.; GOLDBERG, G. The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. **Braz J Med Biol Res.**, v. 33, n. 4, p. 369-378, 2000.
- NICKERSON, T.; MIYAKE, H.; GLEAVE, M. E.; POLLAK, M. Castration-induced apoptosis of androgen-dependent shionogi carcinoma is associated with increased expression of genes encoding insulin-like growth factor-binding proteins. **Cancer Res.**, v. 59, n.14, p. 3392-3395, 1999.
- NIELSEN, S. W.; ATTOSMIS, J. Canine perianal gland tumors. **J Am Vet Med Assoc.**, v. 144, p.127-135, 1964.
- NISHIMURA, M.; SAITO, T.; YAMASAKI, H.; KUDO, R. Suppression of gap junctional intercellular communication via 5' CpG island methylation in promoter region of E-cadherin gene in endometrial cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 10, p. 1615-1623, 2003.
- OMORI, Y.; YAMASAKI, H. Gap junction proteins connexin32 and connexin43 partially acquire growth-suppressive function in HeLa cells by deletion of their C-terminal tails. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 10, p.1913-1918, 1999.
- OWEN, L. N.; BOSTOCK, D. E.; BETTON, G. R.; ONIONS, D. E.; HOLMES, J.; YOXALL, A.; GORMAN, N. The role of spontaneous canine tumours in the evaluation of the aetiology and therapy of human cancer. **J Small Anim Pract.**, v. 16, n. 3, p. 155-162, 1975.
- PAUL, D. L. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. **J Cell Biol.**, v. 103, n. 1, p. 123-134, 1986.
- PAUL, D.L.; YU, K.; BRUZZONE, R.; GIMLICH, R. L.; GOODENOUGH, D. A. Expression of a dominant negative inhibitor of intercellular communication in the early *Xenopus* embryo causes delamination and extrusion of cells. **Development**, v. 121, n. 2, p. 371-381, 1995.

- PERENTES, E.; ARNOLD, J.; MEIER, G.; ETTLIN, R. A.; KARAMITOPOULOU, E.; PRENTICE, D. E. Proliferating cell nuclear antigen expression in Wistar rat livers. A retrospective immunohistochemical study of normal and neoplastic livers. **Exp Toxicol Pathol.**, v. 46, n. 2, p. 105-110, 1994.
- PERKINS, G. A.; GOODENOUGH, D. A.; SOSINSKY, G. E. Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30 degree rotation for interdigitating two apposing connexons. **J Mol Biol.**, v. 277, n. 2, p. 171-177, 1998.
- PFEFFER, S. R.; ROTHMAN, J. E. Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. **Annu Rev Biochem.**, v. 56, p. 829-52, 1987.
- PFEIFER, I.; ANDERSON, C.; WERNER, R.; OLTRA, E. Redefining the structure of the mouse connexin43 gene: selective promoter usage and alternative splicing mechanisms yield transcripts with different translational efficiencies. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, n. 15, p. 4550-4562, 2004.
- PISANI, G.; MILLANTA, F.; LORENZI, D.; VANNOZZI, I.; POLI A. Androgen receptor expression in normal, hyperplastic and neoplastic hepatoid glands in the dog. **Res Vet Sci.**, v. 18, 2006. (Epub ahead of print).
- PITTS, J. D.; SIMMS, J. W. Permeability of junctions between animal cells. Intercellular transfer of nucleotides but not of macromolecules. **Exp Cell Res.**, v. 104, n. 1, p. 153-163, 1977.
- PREZIOSI, R.; DELLA SALDA L.; RICCI, P., SIMONI P., MARCATO P. S. Quantification of nuclear organiser regions in canine perianal gland tumours. **Res Vet Scie**, v. 58, n. 4, p 277-281, 1995.
- PROULX, A. A.; LIN, Z. X.; NAUS, C. C. Transfection of rhabdomyosarcoma cells with connexin43 induces myogenic differentiation. **Cell Growth Differ.**, v. 8, n. 5, p. 533-540, 1997.
- QUIST, A. P.; RHEE, S. K.; LIN, H.; LAL, R. Physiological role of gap-junctional hemichannels. Extracellular calcium-dependent isosmotic volume regulation. **J Cell Biol.**, v. 148, n. 5, p. 1063-1074, 2000.
- RAE, R. S.; MEHTA, P. P.; CHANG, C. C.; TROSKO, J. E.; RUCH, R. J. Neoplastic phenotype of gap-junctional intercellular communication-deficient WB rat liver epithelial cells and its reversal by forced expression of connexin 32. **Mol Carcinog.**, v.22, n. 2, p. 120-127, 1998.
- RAHMAN, S.; CARLILE, G.; EVANS, W. H. Assembly of hepatic gap junctions. Topography and distribution of connexin 32 in intracellular and plasma membranes determined using sequence-specific antibodies. **J Biol Chem.**, v. 268, n. 2, p. 1260-1265, 1993.
- RAHMAN, S.; EVANS, W. H. Topography of connexin32 in rat liver gap junctions. Evidence for an intramolecular disulphide linkage connecting the two extracellular peptide loops. **J Cell Sci.**, v. 100, p. 567-78, 1991. (Pt 3).
- RISEK, B.; GUTHRIE, S.; KUMAR, N.; GILULA, N. B. Modulation of gap junction transcript and protein expression during pregnancy in the rat. **J Cell Biol.**, v. 110, n. 2, p. 269-282, 1990.
- RISEK, B.; KLIER, F.G.; PHILLIPS, A.; HAHN, D. W.; GILULA, N. B. Gap junction regulation in the uterus and ovaries of immature rats by estrogen and progesterone. **J Cell Sci.**, v. 108, p. 1017-1032, 1995. (Pt 3).
- ROGER, C.; MOGRABI, B.; CHEVALLIER D.; MICHIELS J. F.; TANAKA, H.; SEGRETAINE, D.; POINTIS, G.; FENICHEL, P. Disrupted traffic of connexin 43 in human testicular seminoma cells:

overexpression of Cx43 induces membrane location and cell proliferation decrease. **J Pathol.**, v. 202, n. 2, p. :241-246, 2004.

ROSS, J. T.; SCAVELLI, T. D.; MATTHIESEN, D. T.; PATNAIK, A. K. Adenocarcinoma of the apocrine glands of the anal sac in dogs: A review of 32 cases. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 27, p. 349-355, 1991.

SAEZ, J. C.; BERTHOUD, V. M.; BRANES, M. C.; MARTINEZ, A.D.; BEYER, E. C. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. **Physiol Rev.**, v. 83, n. 4, p. 1359-1400, 2003.

SAEZ, J. C.; GREGORY, W. A.; WATANABE, T.; DERMIETZEL, R.; HERTZBERG, E. L.; REID, L.; BENNETT, M. V.; SPRAY, D. C. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 86, n. 8, p. 2708-2712, 1989.

SAEZ, J. C.; MARTINEZ, A. D.; BRANES, M. C.; GONZALEZ, H. E. Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. **Braz J Med Biol Res.**, v.31, n.5, p. 593-600, 1998.

SAEZ, J. C.; NAIRN, A. C.; CZERNIK, A. J.; FISHMAN, G. I.; SPRAY, D. C.; HERTZBERG, E. L. Phosphorylation of connexin43 and the regulation of neonatal rat cardiac myocyte gap junctions. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 29, n. 8, p. 2131-2145, 1997.

SAEZ, J. C.; SPRAY, D. C.; NAIRN, A. C.; HERTZBERG, E.; GREENGARD, P.; BENNETT, M. V. cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27-kDa principal gap junction polypeptide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.83, n.8, p. 2473-2477, 1986.

SAITO, T.; NISHIMURA, M.; KUDO, R.; YAMASAKI, H. Suppressed gap junctional intercellular communication in carcinogenesis of endometrium. **Int J Cancer.**, v. 93, n.3, p. 317-323, 2001.

SAITO, T.; OYAMADA, M.; YAMASAKI, H.; MORI, M.; KUDO, R. Co-ordinated expression of connexins 26 and 32 in human endometrial glandular epithelium during the reproductive cycle and the influence of hormone replacement therapy. **Int J Cancer.**, v. 73, n.4, p. 479-485, 1997.

SAKAMOTO, H.; OYAMADA, M.; ENOMOTO, K.; MORI, M. Differential changes in expression of gap junction proteins connexin 26 and 32 during hepatocarcinogenesis in rats. **Jpn J Cancer Res.**, v. 83, n. 11, p. 1210-1215, 1992.

SCHWARZMANN, G.; WIEGANDT, H.; ROSE, B.; ZIMMERMAN, A.; BEN-HAIM, D.; LOEWENSTEIN, W. R. Diameter of the cell-to-cell junctional membrane channels as probed with neutral molecules. **Science.**, v. 213, n.4507, p. 551-553, 1981.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E.; MULLER & KIRK- Dermatologia de pequenos animais. 5.ed. Rio de Janeiro: Interlivros,. 1996, Cap.19, p. 926-1054.

SHABADASH, S. A.; ZELIKINA, T. I. Once more about hepatoid circumanal glands of dogs. History of their discovery and reasons for revision the structural and functional data. **Izv Akad Nauk Ser Biol.**, v.2, p. 176-185, 2002.

SHABADASH, S. A.; ZELIKINA, T. I. The sex dimorphism of the hepatoid circumanal glands in the dog and the dynamics of its development. **Izv Akad Nauk Ser Biol.**, v.5, p.590-605, 1995 .

SHELLEY, B. A. Use of the carbon dioxide laser for perianal and rectal surgery. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v. 32, n. 3, p. 621-637, 2002.

- SIMPSON, E.; RUBIN, G.; CLYNE, C.; ROBERTSON, K.; O'DONNELL, L.; DAVIS, L. S. ; JONES, M. Local estrogen biosynthesis in males and females. **Endocr Relat Cancer**, v. 6, n. 2, p. 131-137, 1999.
- SOHL, G.; WILLECKE, K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. **Cell Commun Adhes.**, v. 10, n. 4-6, p. 173-180, 2003.
- SOLAN, J. L.; LAMPE, P. D. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. **Biochim Biophys Acta**, v. 1711, n. 2, p. 154-163, 2005.
- STOCK, A.; SIES, H.; STAHL, W. Enhancement of gap junctional communication and connexin43 expression by thyroid hormones. **Biochem Pharmacol.**, v. 55, n. 4, p. 475-479, 1998.
- TANAKA, M.; GROSSMAN, H. B. Connexin 26 induces growth suppression, apoptosis and increased efficacy of doxorubicin in prostate cancer cells. **Oncol Rep.**, v. 11, n. 2, p. 537-541, 2004.
- TEMME, A.; OTT, T.; DOMBROWSKI, F.; WILLECKE, K. The extent of synchronous initiation and termination of DNA synthesis in regenerating mouse liver is dependent on connexin32 expressing gap junctions. **J. Hepatology**, v. 32, n. 4, p. 627-635, 2000.
- TRAUB, O.; LOOK, J.; DERMIETZEL, R.; BRUMMER, F.; HULSER, D.; WILLECKE, K. Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes. **J Cell Bio.**, v. 108, n. 3, p. 1039-1051, 1989.
- TROSKO, J. E. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. **J Biochem Mol Biol.**, v. 36, n. 1, p. 43-48, 2003.
- TROSKO, J. E.; GOODMAN, J. I. Intercellular communication may facilitate apoptosis: implications for tumor promotion. **Mol Carcinog.**, v. 11, n. 1, p. 8-12, 1994.
- TROSKO, J. E.; RUCH, R. J. Cell-cell communication in carcinogenesis. **Front Biosci.**, v. 15, n. 3, p. 208-236, 1998.
- TSAI, H.; WERBER, J.; DAVIA, M.O.; EDELMAN, M.; TANAKA, K. E.; MELMAN, A.; CHRIST, G. J.; GELIEBTER, J. Reduced connexin 43 expression in high grade, human prostatic adenocarcinoma cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 227, n. 1, p. 64-69, 1996.
- UNGER, V. M.; KUMAR, N. M.; GILULA, N. B.; YEAGER, M. Expression, two-dimensional crystallization, and electron cryo-crystallography of recombinant gap junction membrane channels. **J Struct Biol.**, v. 128, n. 1, p. 98-105, 1999.
- UNWIN, P. N. The structure of ion channels in membranes of excitable cells. **Neuron.**, v. 3, n. 6, p. 665-676, 1989.
- UNWIN, P. N.; ZAMPIGHI, G. Structure of the junction between communicating cells. **Nature**, v. 283, n. 5747, p. 545-549, 1980.
- UPHAM, B. L.; WEIS, L. M.; TROSKO, J. E. Modulated gap junctional intercellular communication as a biomarker of PAH epigenetic toxicity: structure-function relationship. **Environ Health Perspect.**, v. 106, n. 4, p. 975-981, 1998.
- VANSLYKE, J. K.; MUSIL, L.S. Analysis of connexin intracellular transport and assembly. **Methods**, v. 20, n. 2, p.156-164, 2000.

- VLATKOVIC, N.; GUERRERA, S.; LI, Y.; LINN, S.; HAINES, D.S.; BOYD, M.T. MDM2 interacts with the C-terminus of the catalytic subunit of DNA polymerase epsilon. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 18, p. 3581-3586, 2000.
- VOZZI, C.; ULLRICH, S.; CHAROLLAIS, A.; PHILIPPE, J.; ORCI, L.; MEDA, P. Adequate connexin-mediated coupling is required for proper insulin production. **J Cell Biol.**, v. 131, n. 6, p. 1561-1572, 1995. Pt 1.
- WASSEM, N. H.; LANE, D. P. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA): structural conservation and the detection of a nucleolar form. **J Cell Sci.**, v. 96, p. 121-129, 1990. Pt 1.
- WATANABE, H.; TONOSAKI, A. Gap junction in apoptosis. In : Progress in cell Research (Y. Kanno, K. Kataoka, Y. Shibata, and T. Shimazu, (Eds), Elsevier, Amsterdam, 1995. vol 4.
- WEBER, P. A.; CHANG, H. C.; SPAETH, K. E.; NITSCHKE, J. M.; NICHOLSON, B. J. The permeability of gap junction channels to probes of different size is dependent on connexin composition and permeant-pore affinities. **Biophys J.**, v. 87, n. 2, p. 958-973, 2004.
- WILSON, G. P.; HAYES JR, H. M. Castration for treatment of perianal gland neoplasms in the dog. **J Am Vet Med Assoc.**, v. 174, n.12, p. 1301-1303, 1979.
- WILSON, M. R.; CLOSE, T. W.; TROSKO, J. E. Cell population dynamics (apoptosis, mitosis, and cell-cell communication) during disruption of homeostasis. **Exp Cell Res.**, v. 254, n. 2, p. 257-268, 2000.
- WITHROW, S. J. Perianal tumours. In: **Withrow SJ, MacEwen EG, ed. Small Animal Clinical oncology**, WB Saunders Co, Philadelphia, USA, p. 261-267, 1997
- WOOD, D. E.; NEWCOMB E. W. Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. **J Biol Chem.**, v. 274, n.12, p.8309-8315, 1999.
- WROBEL, K. H.; BICKEL, D.; KUJAT, R. Immunohistochemical study of seminiferous epithelium in adult bovine testis using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). **Cell Tissue Res.** v. 283, n. 2, p. 191-201, 1996.
- YAMASAKI, H. Aberrant expression and function of gap junctions during carcinogenesis. **Environ Health Perspect.**, v. 93, p. 191-197, 1991.
- YAMASAKI, H. Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. **Carcinogenesis.**, v. 11, n. 7, p. 1051-1058, 1990.
- YAMASAKI, H.; MESNIL, M.; OMORI, Y.; MIRONOV, N.; KRUTOVSKIKH, V. Intercellular communication and carcinogenesis. **Mutat Res.**, v. 333, n. (1-2), p. 181-188, 1995.
- YANO, T.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; OMORI, Y.; YAMASAKI, H. Reduction of malignant phenotype of HEPG2 cell is associated with the expression of connexin 26 but not connexin 32. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 10, p. 1593-1600, 2001.
- YARRINGTON, J.T.; HOFFMAN, W.E.; MACY, D.; HAWKER, C. Morphologic characteristics of the parathyroid and thyroid glands and serum immunoreactive parathyroid hormone in dogs with pseudohyperparathyroidism. **Am J Vet Res.** v.42, n. 2, p. 271-4, 1981.
- YEAGER, M.; UNGER, V. M.; FALK, M. M. Synthesis, assembly and structure of gap junction intercellular channels. **Curr Opin Struct Biol.**, v. 8, n. 4, p. 517-524, 1998.

ZAMPIGHI, G.; UNWIN, P. N. Two forms of isolated gap junctions. **J Mol Biol.**, v. 135, n.2, p. 451-464, 1979.

ZHANG, Y. W.; MORITA, I.; IKEDA, M.; MA, K. W.; MUROTA, S. Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. **Oncogene** , v. 20, n. 31, p. 4138-49, 2001.

9. APÊNDICE

N1 glândulas normais
 HP1 glândulas hiperplásicas
 AD1 adenoma grupo I
 M1 adenoma moderadamente diferenciado grupo II
 P1 adenoma pouco diferenciado grupo II
 CA1 carcinoma grupo III

APÊNDICE 1

One-way Analysis of Variance (ANOVA) **PCNA** (antígeno nuclear de proliferação celular)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.314 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
N1 vs HP1	-0.8316	1.645	ns P>0.05
N1 vs AD1	-0.003421	0.6768	ns P>0.05
N1 vs M1	-0.08245	1.631	ns P>0.05
N1 vs P1	-0.2507	4.960	* P<0.05
N1 vs CA1	-0.5686	11.249	*** P<0.001
HP1 vs AD1	-0.04895	0.9684	ns P>0.05
HP1 vs M1	-0.0007039	0.001393	ns P>0.05
HP1 vs P1	-0.1675	3.315	ns P>0.05
HP1 vs CA1	-0.4854	9.604	*** P<0.001
AD1 vs M1	-0.04824	0.9544	ns P>0.05
AD1 vs P1	-0.2165	4.283	ns P>0.05
AD1 vs CA1	-0.5344	10.572	*** P<0.001
M1 vs P1	-0.16821	3.329	ns P>0.05
M1 vs CA1	-0.4861	9.618	*** P<0.001
P1 vs CA1	-0.3179	6.289	** P<0.01

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval	To
		From	
N1 - HP1	-0.8316	-0.3006	0.1343
N1 - AD1	-0.003421	-0.2517	0.18326
N1 - M	-0.08245	-0.2999	0.1350
N1 - P1	-0.2507	-0.4681	-0.03325
N1 - CA	-0.5686	-0.7860	-0.3512
HP1 - AD	0.04895	-0.1685	0.2664
HP1 - M1	0.0007039	-0.2167	0.2182
HP1 - P1	-0.1675	-0.3850	0.04990
HP1 - CA1	-0.4854	-0.7029	-0.2680
AD1 - M1	-0.04824	-0.2657	0.1692
AD1 - P1	-0.2165	-0.4339	0.0009580
AD1 - CA1	-0.5344	-0.7518	-0.3269
M1 - P1	-0.16821	-0.3857	0.04920

M1 - CA1	-0.4861	-0.7036	-0.2687
P1 - CA1	-0.3179	-0.5353	-0.1005

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs.
This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 39.860

The P value is 0.0001.

Since ANOVA assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log) or selecting a nonparametric test.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions.
This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
N1	0.3909	>0.10	Yes
HP1	0.1944	>0.10	Yes
AD1	0.2665	>0.10	Yes
M1	0.3037	>0.10	Yes
P1	0.2557	>0.10	Yes
CA1	0.3830	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	5	1.368	0.0002094
Residuals (within columns)	30	0.4599	1.134E-05
Total	35	1.828	

$F = 17.844 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of Points	Standard Mean	Standard Error of Deviation	Mean	Median
N	6	0.1175	0.02930	0.01196	0.1239
HP1	6	0.2006	0.08013	0.03271	0.2034
AD1	6	0.1517	0.02668	0.01089	0.1591
M1	6	0.1999	0.03260	0.01331	0.1863
P1	6	0.3682	0.08759	0.03576	0.3781
CA	6	0.6871	0.2743	0.1120	0.8463

Group	95% Confidence Interval			
	Minimum	Maximum	From	To
N1	0.06034	0.1455	0.08671	0.1482
HP1	0.08469	0.2946	0.1165	0.2847
AD1	0.1171	0.1888	0.12370	0.1797
M1	0.1667	0.2452	0.1657	0.2341
P1	0.2450	0.4582	0.2762	0.4601
CA1	0.2842	0.8820	0.3981	0.9740

APÊNDICE 2

One-way Analysis of Variance (ANOVA) **APOPTOSE**

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.314 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
N1 vs HP1	6.457E-06	0.004695	ns P>0.05
N1 vs AD1	-0.005289	3.846	ns P>0.05
N1 vs M1	-0.005165	3.755	ns P>0.05
N1 vs P1	-0.01234	8.555	*** P<0.001
N1 vs CA1	-0.01423	10.345	*** P<0.001
HP1 vs AD1	-0.005296	3.851	ns P>0.05
HP1 vs M1	-0.005171	3.760	ns P>0.05
HP1 vs P1	-0.01235	8.560	*** P<0.001
HP1 vs CA1	-0.01423	10.349	*** P<0.001
AD1 vs M1	0.0001243	0.09038	ns P>0.05
AD1 vs P1	-0.007052	4.889	* P<0.05
AD1 vs CA1	-0.008938	6.499	** P<0.01
M1 vs P1	-0.007176	4.975	* P<0.05
M1 vs CA1	-0.009062	6.589	*** P<0.001
P1 vs CA1	-0.001886	1.308	ns P>0.05

Difference	Mean	95% Confidence Interval	
	Difference	From	To
N1 - HP1	6.457E-06	-0.005926	0.005939
N1 - AD1	-0.005289	-0.01122	0.0006436
N1 - M1	-0.005165	-0.01110	0.0007679
N1 - P1	-0.01234	-0.01856	-0.006118
N1 - CA1	-0.01423	-0.02016	-0.008294
HP1 - AD1	-0.005296	-0.01123	0.0006371
HP1 - M1	-0.005171	-0.01110	0.0007614
HP1 - P1	-0.01235	-0.01857	-0.006125
HP1 - CA1	-0.01423	-0.02017	-0.008301
AD1 - M1	0.0001243	-0.005809	0.006057
AD1 - P1	-0.007052	-0.01327	-0.0008290
AD1 - CA1	-0.008938	-0.01487	-0.003005
M1 - P1	-0.007176	-0.01340	-0.0009533

M1 - CA1	-0.009062	-0.01500	-0.003129
P1 - CA1	-0.001886	-0.008109	0.004336

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 16.882

The P value is 0.0047.

Since ANOVA assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log) or selecting a nonparametric test.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions.

This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
N1	0.2412	>0.10	Yes
HP1	0.3132	>0.10	Yes
AD1	0.3068	>0.10	Yes
M1	0.3010	>0.10	Yes
P1	0.1945	>0.1	Yes
CA1	0.2779	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	5	0.001047	0.0002094
Residuals (within columns)	29	0.0003291	1.134E-05
Total	34	0.001376	

$F = 18.448 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of Points	Standard Mean	Standard Error of Deviation	Mean	Median
N1	6	0.004322	0.001103	0.0004504	0.004358
HP1	6	0.004315	0.001887	0.0007705	0.004411
AD1	6	0.009611	0.002011	0.0008211	0.009675
M	6	0.009487	0.002120	0.0008656	0.01020
P1	5	0.01666	0.005421	0.002424	0.01796
CA1	6	0.01855	0.005385	0.002198	0.01961

Group	95% Confidence Interval		From	To
	Minimum	Maximum		
N1	0.002836	0.005682	0.003164	0.005480
HP1	0.001986	0.006445	0.002335	0.006296
AD1	0.007488	0.01179	0.007500	0.01172
M1	0.006410	0.01185	0.00726	0.01171
P1	0.008850	0.02330	0.009933	0.02339
CA1	0.009259	0.02351	0.01290	0.02420

APÊNDICE 3

One-way Analysis of Variance (ANOVA) **ÍNDICE DE CRESCIMENTO AJUSTADO**

The P value is 0.0107, considered significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.349 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
N1 vs HP1	0.01727	2.256	ns P>0.05
N1 vs AD1	-0.02570	3.521	ns P>0.05
N1 vs M1	-0.002997	0.3916	ns P>0.05
N1 vs P1	-0.007586	0.9911	ns P>0.05
N1 vs CA1	0.009049	1.182	ns P>0.05
HP1 vs AD1	-0.04297	5.614	** P<0.01
HP1 vs M1	-0.02027	2.535	ns P>0.05
HP1 vs P1	-0.02486	3.109	ns P>0.05
HP1 vs CA1	-0.008222	1.029	ns P>0.05
AD1 vs M1	0.02270	2.966	ns P>0.05
AD1 vs P1	0.01811	2.366	ns P>0.05
AD1 vs CA1	0.03475	4.540	* P<0.05
M1 vs P1	-0.004588	0.5739	ns P>0.05
M1 vs CA1	0.01205	1.507	ns P>0.05
P1 vs CA1	0.01663	2.081	ns P>0.05

Difference	95% Confidence Interval		To
	Mean Difference	From	
N1 - HP1	0.01727	-0.01602	0.05056
N1 - AD1	-0.02570	-0.05744	0.006042
N1 - M1	-0.002997	-0.03629	0.03029
N1 - P1	-0.007586	-0.04088	0.02570
N1 - CA1	0.009049	-0.02424	0.04234
HP1 - AD1	-0.04297	-0.07626	-0.009680
HP1 - M1	-0.02027	-0.05504	0.01450
HP1 - P1	-0.02486	-0.05963	0.009913
HP1 - CA1	-0.008222	-0.04299	0.02655
AD1 - M1	0.02270	-0.01059	0.05599
AD1 - P1	0.01811	-0.01518	0.05140
AD1 - CA1	0.03475	0.001458	0.06804

M1 – P	-0.004588	-0.03936	0.03018
M1 - CA1	0.01205	-0.02272	0.04682
P1 - CA1	0.01663	-0.01814	0.05140

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs.
This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 4.335
The P value is 0.5023.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions.
This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P	Value	Passed normality test?
N1	0.1930	>0.10		Yes
HP1	0.2398	>0.10		Yes
AD1	0.1819	>0.10		Yes
M1	0.1674	>0.10		Yes
P1	0.3939	>0.10		Yes
CA1	0.4022	>0.10		Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	5	0.006018	0.001204
Residuals (within columns)	26	0.008308	0.0003195
Total	31	0.01433	

$F = 3.766 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of Points	Standard Mean	Standard Error of Deviation	Mean	Median
N1	6	0.03946	0.01451	0.005923	0.04115
HP1	5	0.02219	0.01317	0.005891	0.01928
AD1	6	0.06516	0.01955	0.007980	0.06743
M1	5	0.04246	0.01047	0.004684	0.04218
P1	5	0.04704	0.02742	0.01226	0.03971
CA1	5	0.03041	0.01735	0.007760	0.02556

Group	95% Confidence Interval		From	To
	Minimum	Maximum		
N1	0.01949	0.06109	0.02423	0.05469
HP1	0.007436	0.04308	0.005835	0.03854
AD1	0.03966	0.09485	0.04464	0.08567
M1	0.03004	0.05571	0.02945	0.05546
P1	0.02704	0.09511	0.01300	0.08109
CA1	0.01951	0.06099	0.008868	0.05195