Patrícia Matsuzaki Terazaki

**Caracterização da próstata canina quanto a aspectos envolvidos
na evolução para o carcinoma prostático**

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 a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof^ª. Dr^ª. Maria Lúcia Zaidan Dagli

**São Paulo
2009**

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2121
FMVZ

Terazaki, Patrícia Matsuzaki

Caracterização da próstata canina quanto a aspectos envolvidos na evolução para o carcinoma prostático / Patrícia Matsuzaki Terazaki. – São Paulo : P. M. Terazaki, 2009.
109 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2009.

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

Orientador: Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli.

1. Cão. 2. Células basais. 3. Imunoistoquímica. 4. Neoplasia intraepitelial prostática. 5. Receptor de andrógeno I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização da próstata canina quanto a aspectos envolvidos na evolução para o carcinoma prostático, com ênfase no papel das conexinas", protocolo nº691/2005, utilizando 50 cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, 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 "ad referendum".

(We certify that the Research "Characterization of canine prostate in relation to aspect involved in the evolution to prostate carcinoma, with emphasis in the role of connexins", protocol number 691/2005, utilizing 50 dogs, under the responsibility of Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, 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 "ad referendum", meeting).

São Paulo, 12 de agosto de 2005

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: TERAZAKI, Patrícia Matsuzaki

Título: Caracterização da próstata canina quanto a aspectos envolvidos na evolução para o carcinoma prostático

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 a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof^a. Dr.^a. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof^a. Dr.^a. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof^a. Dr.^a. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof^a. Dr.^a. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof^a. Dr.^a. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

*Ao meu marido Shigueaki, que sempre deixa
em mim um sorriso calmo para viver*

*À minha orientadora, Malu, que sempre me
guiou com carinho. Obrigada por todos os seus
conselhos, paciência e serenidade.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, meu exemplo. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Idécio Luiz Sinhorini, pela sua enorme sabedoria. Obrigada por ter acompanhado cada passo meu nesta faculdade.

À Profª. Drª. Renée Laufer Amorim, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, por toda sua atenção e auxílio na leitura das lâminas histológicas.

À Profª. Drª Maria Cláudia Nogueira Zerbine, pelas valiosas críticas e sugestões.

Aos meus queridos amigos Bruno, Daniel, Mirela, Márcia, Lucas e Kátia, por toda a experiência, risos, choros e conselhos compartilhados. Obrigada Daniel e Kátia, pelo auxílio na leitura das lâminas histológicas; Márcia, pelo auxílio nas técnicas de cultura celular; Lucas, pelo auxílio na realização do PCR em tempo real e Bruno, pelo auxílio no Western blot e imunistoquímica.

Às minhas comadres Tereza, Silvinha, Mônica e Evelise, pela longa amizade e principalmente por estarem sempre presentes, mesmo longe. Obrigada Tereza, pelo auxílio nas técnicas de imunistoquímica e utilização do sistema de análise de imagens.

À minha amiga Daniella Binokji, que sempre torceu por mim e por poder contar sempre com você. Obrigada amiga!

Ao Raymundo e Edson, pelo companherismo e auxílio na necrópsia dos animais.

Ao Cláudio e Luciano, pela enorme atenção e confecção das lâminas histológicas.

Aos queridos companheiros de laboratório Tarso, Heidge, Andréia, Marquithi, Cyntia, Luciana, Carol e Aninha, por todo o aprendizado e convivência.

À Sr. Elza M. R. B. Faquim, pela extrema gentileza no auxílio da elaboração desta dissertação.

Às secretárias da pós-graduação Claudia Lima, Dayse Maria Alves Flexa e Joana Ferreira Dias de Vasconcelo, por toda a competência e boa vontade.

À Sílvia e Cristina, da Secretaria de pós-graduação do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, pela atenciosidade por todos que a procuram.

À Lívea, Rosiris, Idalina, Herculano, Nelsinho e Shirley, pelo companheirismo e bom-humor desfrutado todos os dias.

À Fundação de Apoio e Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio à pesquisa (05/56291-7) e pela bolsa concedida (processo 04/14528-8).

RESUMO

TERAZAKI, P. M. **Caracterização da próstata canina quanto a aspectos envolvidos na evolução para o carcinoma prostático.** [Characterization of canine prostate in relation to evolution to prostatic carcinoma]. 2009. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O cão é a única espécie, além do homem, em que o câncer de próstata (CP), a neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e a hiperplasia prostática benigna (HPB) ocorrem espontaneamente, permitindo dessa forma que se realize estudo comparativo de afecções benignas e malignas da próstata. Acredita-se que a existência de *stem cells* malignas, localizadas na camada de células basais da próstata, seja um dos fatores responsáveis pelo insucesso da terapia por ablação androgênica que ocorre na maioria dos carcinomas prostáticos avançados. O objetivo deste estudo foi caracterizar a próstata canina quanto a aspectos envolvidos na evolução para o carcinoma prostático, tentando identificar a origem celular e as alterações das lesões pré-neoplásicas. Foram obtidas 44 próstatas na necrópsia. Amostras prostáticas foram fixadas em metacarne, embebidas em parafina e seccionadas a 5µm para a coloração com hematoxilina & eosina (HE) e avaliadas em relação à presença de hiperplasia, prostatite, PIN e neoplasia. Além disso, cortes corados em HE representando cada afecção foram utilizados na determinação da área nuclear média por morfometria computadorizada. Cortes histológicos obtidos em lâminas silanizadas foram utilizados na imunoistoquímica para células basais (p63 e 34βE-12), conexinas 32 e 43, receptor de andrógeno (AR) e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Amostras foram coletadas também em nitrogênio líquido e mantidas a – 80° C para a realização do PCR quantitativo em tempo real, para a determinação da expressão do RNAm do AR, e para a realização do Western blot, para a determinação da expressão da conexina 43. As afecções mais frequentes foram a prostatite e a hiperplasia prostática benigna. Foi observada uma maior porcentagem de células basais e um alto índice proliferativo, como demonstrado pela imunoistoquímica para o PCNA, na neoplasia intraepitelial prostática. Além disso, observou-se nessas lesões marcação nuclear heterogênea para o AR, menor em relação à dos ácinos benignos. Ao contrário do observado na próstata humana, não foi observada expressão das conexinas 32 e 43 na próstata canina (normal ou com PIN). A área nuclear média, obtida pela morfometria computadorizada, foi maior em células epiteliais de ácinos apresentando PIN

e/ou neoplasia em relação à de células epiteliais de ácinos benignos. Observou-se expressão variável do RNAm para o AR nas PINs e neoplasias, utilizando-se o PCR em tempo real. Estes achados sugerem que células basais malignas desempenham papel na origem da neoplasia intraepitelial prostática e possuem capacidade de proliferar a despeito da expressão heterogênea do receptor de andrógeno.

Palavras-chave: Cão. Células basais. Imunoistoquímica. Neoplasia intraepitelial prostática. Receptor de andrógeno.

ABSTRACT

TERAZAKI, P. M. **Characterization of canine prostate in relation to evolution to prostatic carcinoma.** [Caracterização da próstata canina quanto a aspectos envolvidos na evolução para o carcinoma prostático] 2009. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Dogs are the only animal other than man to develop prostate cancer, prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and benign prostatic hyperplasia (HPB) spontaneously, allowing the comparison between benign and malignant affections of prostate. Malignant stem cells among the basal cell layer of the prostate are believed to play an important role in the failure of androgen-ablation therapy that occurs in most advanced prostate cancer. The goal of this study was to characterize the canine prostate in relation to evolution to prostatic carcinoma, trying to identify the cellular origin and the alterations of pre-neoplastic lesions. Forty-four canine prostates were obtained at necropsy. Prostatic samples were fixed in methacarn, embedded in paraffin wax and sectioned into 5µm-thick slices for hematoxylin & eosin (HE) staining and evaluated for the presence of hyperplasia, prostatitis, PIN and neoplasia. Moreover, HE stained sections representing each affection were used to determine the mean nuclear area by computerized morphometry. Tissue sections obtained in silanized slides were used in immunohistochemical staining for basal cells (p63 and 34βE-12), connexins 32 and 43, androgen receptor (AR) and proliferating-cell nuclear antigen (PCNA). Quantitative real-time PCR to determine the expression level of AR at the mRNA level and Western blot to protein levels of connexin 43 were examined in samples collected using liquid nitrogen and kept at – 80° C. The most common lesions were prostatitis and benign prostatic hyperplasia. The prostatic intraepithelial neoplasia exhibited a higher percent of basal cells and was highly proliferative, as demonstrated by PCNA immunohistochemistry. Moreover, these lesions exhibited heterogeneous nuclear AR staining, lower in comparison with benign acini. In contrast to human prostate, the canine prostate (normal or harboring PIN) did not express the connexins 32 and 43. The mean nuclear area measured by computerized morphometry was greater in epithelial cells of PIN and neoplastic acini than that of benign acini. We found variable RNAm AR expression in prostatic intraepithelial neoplasia and neoplasia by real-time PCR. These findings suggest that malignant basal cells may play a role in the origin of PIN and can proliferate despite the heterogeneous AR expression.

Keywords: Androgen receptor. Basal cells. Dog. Immunohistochemistry. Prostatic intraepithelial neoplasia.

LISTA DE SIGLAS

AR	Receptor de andrógeno
HPB	Hiperplasia prostática benigna
CP	Câncer de próstata
DHT	Dihidrotestosterona
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Morfofisiologia prostática.....	18
2.2 Andrógenos e receptor de andrógeno	20
2.3 Conexinas	22
2.4 Hiperplasia prostática benigna	24
2.5 Prostatites, abscessos e cistos prostáticos	25
2.6 Neoplasia intraepitelial prostática (PIN) em humanos	26
2.7 Neoplasia intraepitelial prostática em cães	28
2.8 Carcinoma prostático (CP).....	29
2.9 Biomarcadores do adenocarcinoma e da neoplasia intraepitelial prostática.....	32
3 MATERIAL E MÉTODO	36
3.1 Coleta de próstatas	36
3.2 Imunoistoquímica	36
3.2.1 Receptor de andrógeno	37
3.2.2 PCNA, p63 e 34βE12	39
3.2.3 Conexinas 32 e 43	40
3.3 Morfometria nuclear – área nuclear.....	41
3.4 Western blot para a conexina 43	43
3.5 Extração de RNA	44
3.6 Quantificação do RNA total	44
3.7 Transcrição Reversa.....	45
3.8 qPCR para receptores de andrógeno.....	45
3.9 Análise estatística.....	46
4 RESULTADOS	48
4.1 Avaliação histológica	48
4.1.1 Próstata normal.....	51
4.1.2 Infiltrado inflamatório	54
4.1.3 Hiperplasia prostática benigna.....	55
4.1.4 Atrofia.....	56
4.1.5 Neoplasia intraepitelial prostática	57
4.1.6 Adenocarcinoma.....	58
4.2 Imunoistoquímica	60
4.2.1 Receptor de andrógeno	60
4.2.2 p63	63
4.2.3 Citoqueratina de alto peso molecular 34βE12.....	66
4.2.4 PCNA	69
4.2.5 Conexinas 43 e 32	71
4.3 Morfometria nuclear	71
4.4 Western blot para a conexina 43	71
4.5 Expressão de AR.....	72
5 DISCUSSÃO	77
6 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS*	90

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O cão é a única espécie, além do homem, em que o câncer de próstata (CP) espontâneo ocorre com uma frequência significativa (LOGAN, 1947; BELL et al., 1991). Além disto, são as únicas espécies que, com o envelhecimento, frequentemente desenvolvem hiperplasia prostática benigna (HPB) e se tornam mais propensos ao desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial prostática (PIN) e CP.

A PIN é considerada uma lesão pré-maligna que acomete grande parte dos cães adultos, compartilhando várias características com aquela observada em humanos (WATERS, 1999). Por outro lado, a HPB, que acomete a maioria dos cães adultos inteiros, não é considerada uma lesão pré-maligna. O CP canino, apesar da prevalência relativamente baixa, entre 0,2 a 13% (BELL et al., 1991; TESKE et al., 2002) compartilha várias características com o de humanos, como a morfologia, a presença concomitante de focos de PIN e metástases pulmonares e ósseas (LEAV; LING, 1968; BELL et al., 1991).

Em cães, os fatores envolvidos no processo de carcinogênese, assim como no homem, representados principalmente por um desequilíbrio hormonal advindo com a idade, estão presentes. Não se sabe, porém, os mecanismos por meio dos quais a espécie canina apresenta uma menor incidência deste tumor.

Nos estágios iniciais do CP em humanos, as células prostáticas são dependentes de andrógenos para o crescimento. No entanto, a evolução para um estado de independência a andrógenos fatalmente ocorre em homens submetidos à terapia por supressão hormonal. Atualmente não existe terapia efetiva para o câncer de próstata andrógeno independente (CPAI).

Dentre os mecanismos propostos envolvidos na evolução para o CPAI, destacam-se: 1) amplificação do AR, tornando as células mais sensíveis a um baixo limiar de andrógenos circulantes; 2) aumento da expressão de Bcl2, promovendo uma via de sobrevivência paralela às células; 3) amplificação do receptor de tirosina quinase HER2/neu, que ativaria o AR independentemente de andrógenos; 4) inativação de genes supressores tumorais; e 5) existência de *stem cells* andrógeno-independentes, presentes já nos estágios iniciais do CP (FELDMAN; FELDMAN, 2001).

É importante ressaltar que estas alterações, envolvidas na evolução para o CPAI, não necessariamente surgem nos estágios mais avançados da progressão tumoral. Foi demonstrado

que nos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral as células podem já apresentar potencial metastático, sendo proposto que as mesmas alterações envolvidas no surgimento do tumor também levam à sua progressão (BERNARDS; WEINBERG, 2002). Neste contexto, é importante a caracterização das lesões pré-neoplásicas.

Tem sido proposto que os tumores contêm raras células com características de *stem cells* (*stem cells* tumorais), caracterizadas pela capacidade de auto-renovação ilimitada e habilidade de se diferenciarem em células tumorais proliferativas (REYA et al., 2001; TAN et al., 2006). Tem sido hipotetizado que a forma mais agressiva do carcinoma prostático se origine de *stem cells* positivas para o p63 (GRISANZIO; SIGNORETTI, 2008).

Assim, a caracterização das lesões neoplásicas quanto aos tipos celulares constituintes e suas alterações constitui o primeiro passo na elucidação da origem tumoral. Além da importância de se caracterizar as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas no cão, este representa um modelo válido para o estudo de afecções prostáticas no homem.

Objetivo geral:

Caracterizar a próstata canina quanto a aspectos envolvidos na evolução para o carcinoma prostático, com ênfase no papel das conexinas.

Objetivos específicos:

- 1) Avaliação histológica das próstatas, a fim de se obter a prevalência das diversas afecções nesta espécie.
- 2) Caracterização da neoplasia intraepitelial prostática em relação à sua origem celular, expressão de receptor de andrógeno, índice proliferativo e expressão das conexinas 32 e 43.
- 3) Caracterização das próstatas normais, hiperplásicas e neoplásicas em relação expressão de receptor de andrógeno, índice proliferativo e expressão das conexinas 32 e 43.
- 4) Realização da morfometria nuclear das diversas afecções para obtenção da área nuclear média.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura abordará a morfofisiologia prostática, as principais afecções prostáticas que acometem os cães e o papel dos andrógenos e das conexinas no desenvolvimento normal e afecções da próstata.

2.1 Morfofisiologia prostática

A próstata é a única glândula sexual acessória no cão. Ela é oval a esférica e é dividida em dois lobos por um septo mediano fibroso. Está localizada caudalmente à bexiga, dorsalmente à sínfese púbica e ventralmente ao reto, envolvendo totalmente a uretra proximal (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001).

Em relação ao posicionamento, a próstata pode estar no abdômen caudal ou na cavidade pélvica. Do nascimento aos 2 meses de idade, ela está localizada na região abdominal e, após a cicatrização do úracó remanescente, passa a se localizar na cavidade pélvica na maioria dos casos, dependendo de seu tamanho (BARSANTI; FINCO, 1986; EVANS; CHRISTENSENS, 1993; KUTZLER; YEAGER, 2005).

Sua função é a produção do fluido prostático, que atua como suporte e meio de transporte para os espermatozoides; este fluido entra constantemente nos ductos prostáticos e na uretra prostática (BARSANTI; FINCO, 1986; ENGLAND et al., 1990).

Em cães, a principal proteína secretada na próstata é a esterase específica prostática (ISAACS; SHAPER, 1983; CHAPDELAINE et al., 1984); não se sabe exatamente qual sua função fisiológica, porém sabe-se que está aumentada na hiperplasia prostática benigna.

Em humanos, a principal proteína secretada é o antígeno prostático-específico (WANG; VALENZUELA; CHU, 1979) que, juntamente com a fosfatase ácida, são úteis como marcadores séricos do carcinoma prostático (KURIYAMA et al., 1982).

Tanto os andrógenos quanto os estrógenos atuam no desenvolvimento da próstata normal (WALSH; WILSON, 1976; COFFEY; WALSH, 1990). Com a idade, a próstata aumenta de volume devido à elevação dos níveis de testosterona e, com o decorrer dos anos,

está propensa ao desenvolvimento da hiperplasia prostática benigna. A castração leva à diminuição do volume prostático em 50%, após 3 meses, e em 70%, após 9 meses (BARSANTI; FINCO, 1995).

Poulet (1985) descreve 3 fases de desenvolvimento prostático: cães de até 2 anos, apresentando crescimento prostático normal, com a glândula pesando aproximadamente 0.66g/Kg; cães de 3 a 5 anos, apresentando crescimento prostático hiperplásico, com a glândula pesando entre 0.67g/Kg a 1g/Kg; e cães entre 6 a 16 anos, com a glândula pesando mais de 1g/Kg.

A próstata canina não apresenta divisão em zonas anatômicas, como no homem. Neste último, a próstata é dividida em 4 zonas anatômicas: periférica, central, transicional e periuretral. As hiperplasias em humanos surgem normalmente nas zonas transicional e periuretral, e os carcinomas, na zona periférica (GRIFFITHS et al., 1991; COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1999; DE MARZO; COFFEY; NELSON; 1999). Por outro lado, sabe-se que a próstata canina é histologicamente semelhante à zona periférica da próstata humana (COONEY et al., 1992).

A próstata canina é dividida em lóbulos, sendo estes constituídos por ácinos túbulo-alveolares, originados no ducto uretral, envoltos por um estroma (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001). O epitélio acinar é composto por 2 tipos celulares principais: células luminais secretórias e células basais; o epitélio é duplo quando as células basais estão presentes (OLSON et al., 1987; BARSANTI; FINCO, 1992; MAHAPOKAI et al., 2000). Já nos ductos excretórios que se abrem no interior da uretra, o epitélio é do tipo transicional (BARSANTI; FINCO, 1986; OLSON et al., 1987).

Em humanos, a célula luminal secretória, terminalmente diferenciada e principal constituinte da glândula, é dependente de andrógeno para a sobrevivência. As células da camada basal, relativamente indiferenciadas, não são dependentes de andrógeno para o crescimento, e acredita-se que contenham a população de *stem cells* para as células epiteliais prostáticas (KYPRIANOU; ISAACS, 1988; BONKOFF; REMBERGER, 1993; LAM; REITER, 2006). Em cães submetidos à castração, há uma diminuição da população de células luminais, porém não de células basais, sugerindo que nessa espécie também as células luminais são dependentes de andrógenos, ao contrário das células basais (MAHAPOKAI et al., 2000).

O estroma ao redor das glândulas contém fibroblastos, músculo liso, nervos e vasos linfáticos (BARSANTI; FINCO, 1986). Os efeitos da interação entre o estroma e o epitélio são pouco conhecidos, porém estudos recentes sugerem que o estroma é responsável pela

produção de vários fatores de crescimento que desempenham papel tanto no desenvolvimento da próstata normal quanto no carcinoma prostático.

As afecções prostáticas são muito comuns no cão idoso, e podem ocorrer simultaneamente, com sobreposição de sinais clínicos, o que pode tornar o diagnóstico mais difícil. Com o envelhecimento, a próstata aumenta de volume devido à hiperplasia e, por causa de sua natureza glandular, está propensa à formação de cistos. A prostatite é bastante comum, principalmente por bactérias ascendentes da uretra; pode ser aguda e fulminante ou crônica e insidiosa, podendo levar à formação de abscessos. Está também propensa à formação de neoplasias, principalmente no cão idoso (KRAWIEC, 1994).

2.2 Andrógenos e receptor de andrógeno

O crescimento e a secreção prostática, em todos os mamíferos, são mediados pela dihidrotestosterona (DHT), um metabólito da testosterona formada pela ação da enzima 5 α -reductase (RUSSEL; WILSON, 1994).

Duas isoenzimas, a 5 α -reductase tipo I e tipo II, foram identificadas em tecido de humanos, primatas, cães, ratos e camundongos (LIANG et al., 1985); a próstata canina contém ambas as enzimas (KALMOPATANA, 1998).

A testosterona e a DHT exercem sua ação ligando-se ao receptor de andrógeno (AR). O receptor de andrógeno é um membro da superfamília dos fatores de transcrição nuclear ligante-dependente (EVANS, 1988; O'MALLEY, 1990). Foi descrito pela primeira vez em 1969 (FANG; ANDERSON; LIAO, 1969), sendo o desenvolvimento e a manutenção prostática dependente da ação de andrógenos sobre este receptor (WHITE, 1893; ROY et al., 1999). Este receptor possui 4 domínios principais: amino-terminal (regulador da transcrição), carboxi-terminal (ligação ao andrógeno), de ligação ao DNA e a região hinge (PRINS, 2000). Os domínios de ligação ao DNA e de ligação ao andrógeno são conservados em várias espécies animais, inclusive entre o cão e o homem (LU et al., 2001).

O complexo formado entre o AR e a DHT ou testosterona sofre fosforilação e dimerização, tornando-se um complexo ativado capaz de promover a transcrição de genes que contém sequências específicas de DNA (elementos responsáveis ao andrógeno), envolvidos em várias atividades celulares, como proliferação e apoptose. (BRINKMANN et al., 1999; LU et al., 2001; SO; HURTADO-COOL; GLEAVE, 2003).

Na próstata canina, o AR está presente em células luminais e estromais (LEAV et al., 2001; GALLARDO et al., 2007; LAI et al., 2008). Leav et al. (2001) descreve a presença ocasional deste receptor em células basais acinares, sendo o único estudo descrito na literatura avaliando a expressão do AR em células basais. Na próstata humana, o AR está presente nas células epiteliais luminais e estromais; há controvérsias em relação à presença de AR nas células basais (BONKHOF; REMBERGER, 1993; PRINS et al., 1996; EL-ALFY et al., 1999).

Há evidências de que os andrógenos estejam implicados na carcinogênese prostática. Sabe-se que homens eunucos praticamente não desenvolvem este tumor (WILDING, 1995). Além disso, a incidência é maior em homens que utilizam andrógenos como agentes anabólicos ou terapêuticos (GUINAN et al., 1976; ROBERTS; ESSENHIGH, 1986; JACKSON; WAXMAN; SPIEKERMAN, 1989). Estas observações e o fato da próstata ser um órgão andrógeno-independente levam a crer que o estímulo androgênico anormal esteja relacionado à iniciação e progressão do câncer de próstata.

Em cães, assim como em homens, a propensão ao carcinoma prostático aumenta com a idade (BELL et al., 1991; CORNELL et al., 2000; TESKE et al., 2002). Assim, apesar da maioria dos tumores prostáticos em cães não responder à castração, o estímulo androgênico anormal deve estar relacionado à iniciação e progressão do carcinoma prostático nessa espécie também. Além disso, a incidência da PIN é maior em animais inteiros em relação aos castrados (WATERS; BOSTWICK, 1997).

A expressão de AR em carcinomas prostáticos em cães é variável entre os estudos descritos na literatura. Lai et al. (2008) encontrou, por imunoistoquímica, marcação positiva para o AR em 8 de 9 tumores prostáticos de cães inteiros, e em 8 de 11 tumores prostáticos de cães castrados, embora de menor intensidade em relação às células normais. Já Leav et al (2001), estudando 19 carcinomas caninos demonstrou que 18 dos 19 tumores não expressavam AR. Outro estudo comparando a expressão diferencial desse receptor em próstatas normais, hiperplásicas, inflamadas e neoplásicas mostrou que o receptor está presente em 65% das células neoplásicas, contra 100% em células de próstatas normais e hiperplásicas e 74% em células de próstatas inflamadas (GALLARDO et al., 2007).

O AR é expresso em células de PIN e em adenocarcinomas em humanos, embora a expressão seja heterogênea nesta última afecção (SADI; WALSH; BARRACK, 1991; DE WINTER et al., 1994; VAN DER KWAST; TÊTU, 1996; HARPER et al., 1998).

Em humanos, a amplificação do AR está presente em 20 a 30% dos adenocarcinomas andrógeno-independentes (FENTON et al., 1997; FELDMAN; FELDMAN, 2001), e

mutações no gene para este receptor está presente em 10 a 20% dos casos (SUZUKI et al., 1993; GADDIPATI et al., 1994; TAPLIN et al., 1999). Já o poliformismo do gene codificador do AR, localizado no braço longo do cromossomo X, apresenta no exon 1 uma área repetitiva CAG, que é variável em seu tamanho. Quanto menor esta zona de polimorfismo, maior a sensibilidade ao andrógeno. Os asiáticos, pouco acometidos pelo câncer de próstata, possuem esta região longa, diferente dos negros que possuem esta região muito curta. Isto poderia explicar parcialmente a maior incidência e maior agressividade deste carcinoma nos afro-americanos.

Em um estudo recente, Lai et al. (2008), analisando em cães 32 adenocarcinomas prostáticos e 172 próstatas normais verificou que a região repetitiva CAG, similarmente aos humanos, também é menor nos adenocarcinomas. Todavia, esta região é menor em cães, apresentando 10 a 12 repetições (LAI et al., 2008), em relação aos humanos, que apresenta 11 a 31 repetições (EDWARDS et al., 1992).

Como regiões CAG mais curtas codificam AR com maior atividade transcricional (GAO; MARCELLI; MCPHAUL, 1996), os cães possivelmente possuem AR com maior atividade transcricional em relação aos humanos.

Não há relatos na literatura a respeito da expressão desse receptor em PIN canina; assim pretendemos nesse projeto comparar a expressão de AR em próstatas normais, hiperplásicas, com PINs e neoplásicas.

2.3 Conexinas

Atualmente, sabe-se que hormônios sexuais regulam uma variedade de genes associados ao câncer, entre eles as conexinas (PETROCELLI; LYE 1993; HUYNH et al., 2001).

As conexinas (Cx) são proteínas de membrana que se oligomerizam em canais intercelulares denominados junções *gap* (GOODENOUGH, 1975), sendo estas as junções comunicantes mais freqüentemente encontradas na maioria dos tecidos animais, em praticamente todas as espécies. Estas junções permitem que as células em tecidos compartilhem íons, segundos mensageiros e pequenos metabólitos, desempenhando importante papel na regulação da homeostasia tecidual (FISHMAN et al., 1991; GOODENOUGH et al., 1996). Tais junções não são idênticas em todos os tecidos, porém

compartilham uma estrutura básica. Um canal de junção do tipo *gap*, o *conexon*, consiste de dois hemicanais justapostos, cada um fornecido por uma célula adjacente. Cada conexon é composto por seis subunidades de proteínas de membrana, as *conexinas*, proteínas filogeneticamente conservadas (GOODENOUGH et al., 1996).

Muitas evidências têm demonstrado uma ligação entre alterações na comunicação intercelular por meio de junções *gap* (GJIC) e crescimento celular anormal (YAMASAKI; NAUS, 1996; YAMASAKI et al., 1999). Enquanto muitos promotores tumorais, fatores de crescimento e produtos de oncogenes tendem a regular negativamente as GJIC, vários compostos propostos como quimiopreventivos contra o câncer tendem a regulá-las positivamente (RUCH, 1994).

Há relatos de que a próstata humana expressa as conexinas 32, 43 e 26 (TSAI et al., 1996; EL-ALFY et al., 2000; HABERMANN et al., 2002). Estudo imunoistoquímico realizado em próstatas humanas revelou que a Cx43 se encontra nas células epiteliais basais, enquanto que a Cx32 está localizada nas células epiteliais luminais, tanto nos casos de HPB e CP, quanto na próstata normal (HABERMANN et al., 2002). Este estudo mostrou que na BPH há um aumento na expressão das Cx43 e 32, enquanto que no CP há uma diminuição destas duas conexinas, em relação à próstata normal.

Um recente estudo revelou que os níveis de expressão das Cx43 e 32 parecem estar inversamente relacionadas; linhagens não tumorigênicas de próstata humana apresentam uma maior proporção de Cx43 para Cx32 em comparação a linhagens tumorigênicas (SALADINO et al., 2002).

Em estudo *in vitro* utilizando linhagens humanas de câncer de próstata, a expressão forçada das Cx43 e 32 resultou no acúmulo intracelular destas conexinas. A expressão de α -catenina nestas células facilitou o tráfico destas conexinas para a membrana, sugerindo que o tráfico das Cx43 e 32 possa estar prejudicada nestas células (GOVINDARAJAN et al., 2002). Além disto, Osterreich (2003) demonstrou que o promotor da caderina E está ligado ao receptor de estrógeno, e que há uma diminuição da expressão desta caderina (proteína e RNAm) mediada pelo estrógeno.

Apesar de nenhum elemento andrógeno-responsivo ter sido identificado no gene da Cx43, o promotor deste gene contém vários sítios que, em outros promotores, interagem com receptores hormonais, inclusive o receptor de andrógeno (KRISHNAN; WANG; SAFE, 1994; Umayahara et al., 1994).

Não há estudos na literatura avaliando a expressão de conexinas em próstata normal, nem na HPB, PIN e CP em cães. Park et al. (2003), entretanto, demonstrou a ocorrência de

efeito *bystander*, provavelmente devido à presença de GJIC, em próstata de cães submetidos à terapia gênica com HSV-TK (herpes simplex virus thymidine kinase) e aciclovir.

Assim, mais esforços são necessários para se esclarecer a relação entre andrógenos e conexinas, assim como o papel destas últimas no processo de carcinogênese da próstata.

2.4 Hiperplasia prostática benigna

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é uma alteração extremamente comum no cão idoso, resultante da hiperplasia do epitélio glandular e/ou do estroma fibromuscular. Sua etiologia ainda não está bem esclarecida, mas sabe-se que está relacionada à idade e à desregulação endócrina, como alteração na taxa de andrógeno:estrógeno secretada pelos testículos (THALEN; FORSBERG, 1993). Nesse contexto, o aumento de DHT na próstata é um dos responsáveis pelo desenvolvimento dessa afecção (GLOYNA; SIITERI; WILSON, 1970; BARSANTI; FINCO, 1986).

A prevalência da HPB em cães com mais de 5 anos de idade é de 80% e em cães de 7 a 8 anos de idade chega a 100% (BERRY et al., 1986; LOWSETH et al., 1990; JOHNSTON et al., 2000).

Apenas a espécie humana e a canina desenvolvem espontaneamente a HPB com o decorrer da idade. Existem, entretanto, diferenças no que concerne ao desenvolvimento desta afecção entre essas duas espécies. Em humanos a HPB é um processo nodular que se origina na zona de transição, ocorrendo a formação de novas glândulas e proliferação estromal, em direção à uretra (MCNEAL, 1983). Em contraste, a HPB canina é um processo difuso em que há um aumento do epitélio secretório de ácinos pré-existentes, com expansão para fora da uretra; a proliferação estromal nessa espécie ocorre na forma complexa da HPB (MCNEAL, 1983; STRANDBERG; BERRY, 1985; LOWSETH et al., 1990).

Há dois tipos de HPB em cães: a epitelial e a complexa. Na primeira, ocorre um aumento do epitélio secretório, com aumento do número de projeções papilares para dentro dos alvéolos; células secretórias individuais encontram-se aumentadas por um aumento na quantidade de citoplasma. A forma complexa é caracterizada pela existência de áreas de hiperplasia epitelial e alvéolos císticos; nas áreas císticas há um aumento absoluto ou relativo de estroma fibromuscular (KENNEDY et al., 1998). Acredita-se que a forma complexa

origem-se da forma epitelial, ocorrendo em cães mais velhos, acima de 6 anos de idade (BERRY et al., 1986; LOWSETH et al., 1990).

Infiltrado inflamatório é freqüentemente observado concomitantemente a BPH, porém há controvérsias se o processo de prostatite precede as alterações hiperplásicas ou vice-versa (MAHAPOKAI et al., 2001).

Na HPB pode ou não haver sintomatologia clínica, como o tenesmo, e ao exame físico a próstata se apresenta simetricamente aumentada, indolor e de consistência normal (BARSANTI; FINCO, 1986). O volume prostático é de 2 a 6.5 vezes maior que o volume de próstatas normais de animais de pesos semelhantes (HORNBUCKLE et al., 1978; LAROQUE et al., 1995).

2.5 Prostatites, abscessos e cistos prostáticos

A prostatite é muito comum em cães, sendo freqüente em cães idosos com alterações hiperplásicas. Os agentes envolvidos incluem patógenos urinários como *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus spp* e *Staphylococcus aureus*, porém a infecção pode ocorrer por via hematógena, como extensão de infecção da bexiga ou de outros locais do trato reprodutivo, via sêmen (BARSANTI; FINCO, 1986; JOHNSTON et al., 2000).

A prostatite aguda pode ser focal ou difusa; na prostatite difusa, a glândula freqüentemente apresenta-se assimetricamente aumentada, congesta e edematosa. A inflamação aguda pode resolver-se ou tornar-se crônica, especialmente se os ductos estiverem obstruídos. A prostatite crônica pode também ocorrer sem prévia prostatite aguda clinicamente evidente, devido a alterações na arquitetura prostática que interferem na secreção do fluido prostático, como cistos, neoplasias ou metaplasia escamosa (BARSANTI; FINCO, 1986). Na prostatite crônica o epitélio encontra-se atrófico, e o lúmen acinar apresenta neutrófilos, macrófagos e debris; linfócitos são freqüentemente encontrados no estroma.

A sintomatologia clínica da prostatite aguda inclui sinais de doença sistêmica, como febre, anorexia, depressão, vômito, dor abdominal e rigidez, podendo ocorrer descarga uretral constante ou intermitente (BARSANTI; FINCO, 1986). A próstata é dolorosa à palpação, normalmente simétrica e seu tamanho freqüentemente está normal ou moderadamente aumentado (BARSANTI; FINCO, 1986).

Na prostatite crônica pode não haver nenhuma sintomatologia clínica relacionada à próstata, porém o animal pode apresentar episódios recorrentes de cistite ou infecção do trato urinário (BARSANTI; FINCO, 1986). À palpação, a próstata é indolor, e seu tamanho e simetria dependem do grau de hiperplasia e fibrose presentes.

Os abscessos prostáticos são formas severas de prostatite bacteriana crônica, onde se formam coleções de conteúdo purulento dentro do parênquima prostático. Os animais podem apresentar sintomatologia relacionada ao aumento do volume prostático ou à infecção. À palpação, a próstata pode ou não estar aumentada de volume, dependendo do tamanho e localização dos abscessos, e freqüentemente encontra-se assimétrica (BARSANTI; FINCO, 1986).

Os cistos são classificados em cistos de retenção e paraprostáticos. São lesões cavitárias com parede distinta, contendo fluido claro, dentro (cisto de retenção) ou fora (cisto paraprostático) do parênquima prostático (WHITE; HERRTAGE; DENNIS, 1987). Podem estar associados à HPB, formados quando há obstrução de canalículos, levando ao acúmulo de fluido prostático (BARSANTI; FINCO, 1986).

As alterações císticas iniciais não são perceptíveis macroscopicamente, porém com a evolução os cistos passam a se comunicar entre si, tornando-se evidentes macroscopicamente, recebendo então a denominação de cistos prostáticos (BLACK et al., 1998).

A patogenia é incerta, porém é freqüente a ocorrência de cistos de retenção concomitantemente a tumores de células de Sertoli, sugerindo que possa ser decorrente da dilatação acinar secundária a metaplasia escamosa induzida por estrógenos. Já os cistos paraprostáticos provavelmente se originam de restos embrionários dos ductos Mulerianos (JOHNSTON et al., 2001). Os animais podem permanecer assintomáticos ou apresentarem sinais relacionados à HPB (JOHNSTON et al., 2000).

2.6 Neoplasia intraepitelial prostática (PIN) em humanos

A neoplasia intraepitelial prostática foi descrita pela primeira vez em 1969, porém sob a denominação de “displasia intraductal” (MCNEAL, 1969), sendo posteriormente melhor caracterizada (MCNEAL; BOSTWICK, 1986). Vários sinônimos foram dados a esta lesão, caracterizada por uma proliferação e displasia das células que formam os ácinos e ductos; neoplasia intraepitelial prostática é o termo atualmente aceito.

A PIN é caracterizada por um espectro de atipias citológicas, que vão desde pequenas alterações celulares a alterações mais intensas, tornando as células indistinguíveis de células neoplásicas (AMIN et al., 1993).

À microscopia em pequeno aumento, as glândulas com PIN são basofílicas, e sua arquitetura é semelhante à de glândulas normais, sendo largas e apresentando projeções papilares. Sua aparência basofílica se deve à presença de hipercromasia, aumento nuclear e citoplasma anfifílico (EPSTEIN, 2009). Essa lesão é classificada na medicina humana em PIN de baixo ou alto grau.

Na PIN de baixo grau (LGPIN) as células apresentam núcleos aumentados, de vários tamanhos, cromatina normal ou levemente condensada e pequenos nucléolos. A PIN de alto grau (HGPIN) é caracterizada por células com núcleos aumentados e de tamanhos relativamente uniformes, aumento de cromatina, que pode estar irregularmente distribuída e nucléolos evidentes, semelhantes aos encontrados no carcinoma (MCNEAL; BOSTWICK, 1986; MONTIRONI; MAZZUCHELLI; SCARPELLI, 2002). A HGPIN é citologicamente indistinguível do carcinoma prostático; a principal diferença reside na presença da camada de células basais na HGPIN, embora freqüentemente com rupturas (BRAWER, 1992).

A HGPIN em humanos é a precursora mais provável do adenocarcinoma prostático. Comparando próstatas com e sem carcinoma, há um aumento na incidência, tamanho e número de focos de HGPIN nessas últimas (BOSTWICK; QIAN, 2004; JONIAU et al., 2005). Por outro lado, há evidências de que nem todos os CP originam-se a partir de HGPIN. Em próstatas apresentando HGPIN e carcinoma, apenas em um terço dos casos o HGPIN está adjacente ao carcinoma (SAKR et al., 1994, 2003). Além disso, carcinomas de baixo grau, especialmente aqueles originários da zona de transição, não parecem estar intimamente relacionados ao HGPIN (EPSTEIN, 2009).

A incidência de PIN, por biópsias de agulha, varia entre 0 a 24.6% (EPSTEIN; HERAWI, 2006), sendo a incidência média de 7.6%. Uma das explicações para essa variação é a de que não existem critérios que defina o quão proeminente devem ser os nucléolos para as lesões serem consideradas HGPIN. Essa lesão deve, no entanto, ser diferenciada de atipias celulares induzidas pela inflamação, metaplasia de células de transição, hiperplasia atípica de células basais, ductos ejaculatórios e epitélio de vesículas seminais (EPSTEIN, 2009).

Estudos mais recentes mostram que o risco de câncer após o diagnóstico de HGPIN em biópsia de agulha é de 22%, contra os 50% relatado em estudo da década de 90, com uma amostragem pequena (EPSTEIN; HERAWI, 2006). De 12 publicações sobre o risco de câncer em rebiópsia após o diagnóstico de HGPIN ou diagnóstico benigno em biópsia de agulha,

apenas 3 relataram um risco aumentado após diagnóstico de HGPIN (EPSTEIN; HERAWI, 2006).

Valores séricos de PSA, toque retal e estudo de imagens não identificam quais homens apresentando HGPIN irão evoluir para o CP. Entretanto, na biópsia prostática por agulha, um número de fragmentos apresentando HGPIN maior que 3 está associado a um maior risco de diagnóstico de CP em rebiópsia (NETTO; EPSTEIN, 2006; AKHAVAN et al., 2007).

As HGPIN apresentam freqüentemente a camada de células basais descontínua, como demonstrado por imunoistoquímica utilizando marcadores de células basais (EPSTEIN, 2009).

A progressão do HGPIN para o carcinoma é um processo complexo onde ocorre aumento da proliferação celular, diminuição da morte celular, ou ambos (COLOMBEL et al., 1993; MONTIRONI et al., 1993); estas alterações dependem de vários fatores, incluindo o status hormonal. Características genótípicas e fenotípicas contínuas a partir de ácinos benignos, PIN de baixo grau, PIN de alto grau e carcinoma têm sido observadas (BOSTWICK; PACELLI; LOPEZ-BELTRAN, 1996), embora não se tenha provado diretamente que esta via sequencial ocorra.

A invasão estromal, evidência inicial do carcinoma, é observada em aproximadamente 2% dos HGPIN (BOSTWICK; BRAWER, 1987; MONTIRONI et al., 2000).

2.7 Neoplasia intraepitelial prostática em cães

A PIN é considerada uma lesão pré-maligna que pode acometer cães adultos, compartilhando várias características citológicas com aquela observada em humanos, como aglomeração celular, perda de polaridade e aumento nuclear e nucleolar iguais às exibidas em humanos (WATERS; BOSTWICK, 1997). As bordas celulares freqüentemente são inaparentes (WATERS et al., 1997). Além disso, os cães desenvolvem PIN e metástases ósseas similarmente ao observado em humanos (WATERS et al., 1997; WATERS, 1999; ROSOL et al., 2003).

Waters e Bostwick (1997) classificaram a PIN canina em 4 tipos, segundo seu padrão arquitetural: sólido, micropapilar, cribiforme e plana.

A prevalência de PIN em cães varia entre as publicações realizadas desde 1997. Em estudo de Waters e Bostwick (1997), esta lesão foi identificada em 6 de 11 (55%) cães

inteiros de 7 a 17 anos sem evidência de afecção prostática e em 19 de 29 (66%) cães com adenocarcinoma protático.

Já Aquilina et al. (2008) realizou estudo retrospectivo com cães militares, que não compartilhariam os mesmos fatores ambientais com humanos, utilizando-se tecido prostático de 199 animais provenientes de necropsia sem diagnóstico de carcinoma e de 25 animais com CP. A prevalência de PIN relatada nesse estudo foi de 3% em animais sem CP, enquanto que a prevalência nos animais apresentando cacinoma foi de 72%.

Já Madewell et al. (2004) relatou a presença desta afecção em 7 de 20 (35%) carcinomas, ao avaliar tecidos prostáticos de 115 animais provenientes de necropsia ou biópsia; por outro lado, não encontrou focos de HGPIN em próstatas normais. Cornell et al. (2000) relatou a presença de PIN em apenas 5 de 76 (7%) carcinomas.

Considerando que as alterações envolvidas no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas possam também desempenhar papel na progressão tumoral, é importante a caracterização dessas lesões. Assim, pretendemos caracterizar essa lesão na espécie canina utilizando alguns biomarcadores utilizados em medicina humana.

2.8 Carcinoma prostático (CP)

O cão é a única espécie, além da humana, em que o carcinoma prostático ocorre espontaneamente (LOGAN, 1947; BELL et al., 1991). Teske et al. (2002) em estudo retrospectivo com 431 cães encontrou uma prevalência de 13% de CP nessa espécie. Já Weaver (1981) e Bell et al. (1991) relatam menores prevalências, entre 3.5% e 0.2 a 0.6%, respectivamente.

O carcinoma prostático é mais comum em cães idosos, especialmente naqueles acima de 10 anos de idade, e é clinicamente agressivo, apresentando frequentemente metástases em linfonodos regionais, pulmão e ossos (O'SHEA, 1963; LEAV; LING, 1968; BELL et al., 1991). Uma das hipóteses para essa agressividade seria o diagnóstico tardio realizado nessa espécie.

O CP canino compartilha várias características com o de humanos, como a morfologia, a presença concomitante de focos de PIN e metástases pulmonares e ósseas (LEAV; LING, 1968; BELL et al., 1991).

Sinais clínicos como tenesmo e disúria estão freqüentemente associados ao aumento do volume prostático, podendo ocorrer hematúria, anorexia e perda de peso (BARSANTI; FINCO, 1986; CORNELL et al., 1997). À palpação, a próstata normalmente é imóvel, podendo apresentar-se assimétrica devido à presença de nódulos firmes (BARSANTI; FINCO, 1986). O prognóstico sombrio associado ao carcinoma prostático pode ser atribuído em parte ao diagnóstico tardio, pois não se utiliza, como em humanos, marcadores bioquímicos como o PSA para a detecção precoce.

De acordo com a World Health Organization, as neoplasias prostáticas em cães são classificadas em 2 grandes grupos: adenocarcinoma e carcinoma pobremente diferenciado (OWEN, 1980). Os adenocarcinomas são classificados em intra-alveolar e acinar.

O adenocarcinoma intra-alveolar consiste de múltiplos focos contendo ácinos de formato irregular, contendo células neoplásicas irradiando-se a partir de uma densa camada basal em direção ao lumen (KENNEDY et al., 1998). Já no adenocarcinoma acinar, as células neoplásicas são cubóides e arranjadas em pequenos ácinos, encontrando-se mergulhadas em um estroma bastante proliferativo (KENNEDY et al., 1998).

Alguns estudos descrevem ainda outros tipos histopatológicos, como o carcinoma urotelial, de células escamosas, sarcomatóide e epitelial discreto (BELL et al., 1991; WATERS et al., 1998; CORNELL et al., 2000). A distinção destes pode ser muito difícil, necessitando às vezes de cuidadosa dissecação e realização de imunoistoquímica. Além disso, freqüentemente se encontram padrões heterogêneos, com mais de um tipo histológico (BELL et al., 1991; CORNELL et al., 2000).

A grande diferença em relação aos humanos é a grande incidência de tumores andrógeno-independente em cães, que não respondem à ablação androgênica (JOHNSTON et al., 2000). Estudos mostram um aumento na incidência de carcinoma prostático em cães submetidos à castração (OBRADOVICH et al., 1987; BELL et al., 1991; TESKE et al., 2002; BRYAN et al., 2007); já homens orquiectomizados não desenvolvem CP (WILDING, 1995). Além disso, estudos mostram que o CP apresenta comportamento biológico mais agressivo em cães orquiectomizados em comparação aos inteiros (BELL et al., 1991; TESKE et al., 2002).

Em humanos, o câncer de próstata é relatado como a segunda causa de óbitos por câncer (BORING et al., 1994). A incidência está aumentando de forma acelerada, independente da faixa etária da população, nos diversos países. Este aumento pode ser parcialmente justificado pela evolução dos métodos diagnósticos.

Embora os fatores relacionados ao desenvolvimento do PC sejam pouco compreendidos, sabe-se que a idade, raça, histórico familiar e dieta são fatores de risco importantes (CARTER, 1990; BRAWLEY; KNOPF; THOMPSON, 1998). Aproximadamente 10% dos PC são hereditários, sendo os carcinomas espontâneos responsáveis por 90% dos casos.

A origem celular do CP é controversa: alguns estudos indicam que surgem a partir de células luminais, pois expressam marcadores específicos de células luminais, porém não de células basais (NAGLE et al., 1987; SIGNORETTI et al., 2000); outros estudos sugerem que o carcinoma é originado de células progenitoras intermediárias que adquiriram a capacidade de proliferação (VAN LEENDERS; SCHALKEN, 2001). Já Liu et al. (2002) observou que a maioria dos tumores primários consiste de células luminais, enquanto que as metástases apresentam células basais.

Nos estágios iniciais do CP em humanos, as células prostáticas são dependentes de andrógenos para o crescimento. No entanto, a evolução para um estado de independência a andrógenos (CPAI) fatalmente ocorre em homens submetidos à terapia por supressão hormonal (FELDMAN; FELDMAN, 2001).

Sabe-se que embora a ablação androgênica resulte em uma diminuição de 95% da testosterona sérica, a concentração de dihidrotestosterona na próstata é reduzida em apenas 60% (LABRIE et al., 1986). Atualmente não existe terapia efetiva para o CPAI.

Dentre os mecanismos propostos envolvidos na evolução para o CPAI, destacam-se: 1) amplificação do AR, tornando as células mais sensíveis a um baixo limiar de andrógenos circulantes; 2) aumento da expressão de Bcl2, promovendo uma via de sobrevivência paralela às células; 3) amplificação do receptor de tirosina quinase HER2/neu, que ativaria o AR independentemente de andrógenos; 4) inativação de genes supressores tumorais; e 5) existência de *stem cells* andrógeno-independentes, presentes já nos estágios iniciais do CP (FELDMAN; FELDMAN, 2001).

Em humanos, a perda da habilidade de responder aos andrógenos não deve ser um evento inicial na progressão tumoral, visto que tanto PINs quanto carcinomas primários expressam AR (SADI; WALSH; BARRACK, 1991; DE WINTER et al., 1994; VAN DER KWAST; TÊTU, 1996; HARPER et al., 1998). Em cães, não há relatos sobre a expressão de AR em PINs; já em carcinomas, a expressão deste receptor é variável entre os estudos descritos na literatura, conforme citado anteriormente.

A classificação dos CP em humanos é feita pelo sistema Gleason, baseando-se na diferenciação glandular e no padrão de crescimento em relação ao estroma, não sendo

consideradas as atipias nucleares (GLEASON, 1977; GLEASON, 1990). De acordo com esse sistema, o grau histológico poderá ser de 1 a 5 e a contagem final de 2 a 10, onde é considerado tanto o padrão principal quanto o secundário. Assim, por exemplo, se o grau histológico de 90% da área examinada for 3 e o de 10% for 4, o grau do tecido neoplásico será $3 + 4 = 7$; caso o grau seja o mesmo em toda a área examinada, repete-se o número.

No grau 1 não há caráter infiltrativo, sendo a neoplasia bem delimitada e diagnosticada pelo desarranjo arquitetural; já no grau 2, a neoplasia não é tão bem delimitada, havendo uma maior distância entre os ácinos neoplásicos. No grau 3 ocorre infiltração neoplásica, podendo ser observado arranjo cribriforme. No grau 4, além do caráter infiltrativo, há proximidade entre os ácinos, resultando em fusão entre os mesmos. Finalmente, o grau 5 apresenta-se em arranjo sólido, podendo ser observadas células neoplásicas isoladas ou em arranjo trabecular (BILLIS; POMPEO, 2003.)

2.9 Biomarcadores do adenocarcinoma e da neoplasia intraepitelial prostática

Vários biomarcadores séricos e histológicos têm sido avaliados como preditivos, diagnósticos e prognósticos do carcinoma prostático humano. O sistema Gleason e a extensão da neoplasia (estágio), por exemplo, são importantes para avaliar o risco de progressão e metástase (EPSTEIN, 2001; ALBERTSEN, 2005).

Outros parâmetros, além do PSA, estágio e grau, têm sido estudados, como a morfometria nuclear e marcadores de proliferação.

A morfometria nuclear estuda alguns parâmetros do núcleo como tamanho, forma e padrão cromatínico. Estudos mostram que essas características nas células malignas são diferentes daquelas observadas nas células normais (BAAK, 1987; COLLAN et al., 1987; VELTRI et al., 1994; VELTRI; PARTIN; MILLER, 2000). Diamond et al (1982) utilizaram pela primeira vez a medição do tamanho nuclear como fator prognóstico em adenocarcinomas de próstata, observando que metástases são mais frequentemente observadas em neoplasias cujos núcleos são maiores.

O PCNA é um antígeno relacionado à proliferação celular, sendo um cofator da DNA polimerase-delta; sua síntese é máxima na fase S do ciclo celular e durante processos de reparação de DNA onde há síntese de DNA (BRAVO et al., 1987).

Foi demonstrado, por imunoistoquímica e quantificação por PCR, que a expressão de PCNA é maior em linhagens celulares de câncer de próstata em relação à de linhagem celular epitelial de próstata normal, e maior em CP em relação à de HPB e próstata normal (ZHONG et al., 2008). Miyamoto et al. (2006), estudando 60 casos de CP, mostrou que o índice proliferativo estava aumentado em pacientes em estágio clínico avançado, alto grau de Gleason e valores de PSA > 100ng/mL. Já Helpap (1995) mostrou que o índice proliferativo é maior em PIN em relação ao epitélio benigno.

Acredita-se que na camada de células basais dos ácinos prostáticos exista uma discreta população de células indiferenciadas, as *stem cells*, que possuem a habilidade de se diferenciarem em células basais e células luminais (ISAACS, 1987; BURGER et al., 2005; XIN; LAWSON; WITTE, 2005; LAWSON et al., 2007). Há evidências da existência dessas células em vários tecidos, incluindo a próstata (BURGER et al., 2005; XIN; LAWSON; WITTE, 2005; LAWSON et al., 2007).

Em camundongos, as *stem cells* prostáticas expressam marcadores de células basais, como a citoqueratina 5, p63 e integrina $\alpha 6$ (WANG et al., 2006; LAWSON et al., 2007), e possivelmente marcadores únicos desse tipo celular, como o stem cell antígeno 1 (Sca 1) (BURGER et al., 2005; LAWSON et al., 2007; WITTE, 2005; WANG et al., 2006). Em humanos, as *stem cells* também são caracterizadas por marcadores basais, como citoqueratinas 5 e 14, assim como expressão de CD133 e integrina $\alpha 2/\beta 1$ (COLLINS et al., 2001; RICHARDSON et al., 2004; MIKI et al., 2007).

Estudos em próstata utilizando populações mistas de células positivas para os marcadores Sca 1 e integrina $\alpha 6$, de camundongos, e CD44, CD133 e integrina $\alpha 2/\beta 1$, de humanos, com a geração de estruturas ductais, suporta a existência de *stem cells* na próstata (BURGER et al., 2005; COLLINS et al., 2005; XIN; LAWSON; WITTE, 2005; LAWSON et al., 2007; MIKI et al., 2007).

Tem sido demonstrado que a proteína nuclear p63, descoberta há uma década, desempenha importante papel no desenvolvimento prostático, sendo altamente expressa por células basais prostáticas (YANG et al., 1998; SIGNORETTI et al., 2002).

Signoretti et al. (2000) demonstrou que camundongos p63 $-/-$ não desenvolvem próstata, sugerindo que esta proteína é importante no desenvolvimento prostático. Entretanto, Kurita et al. (2004) demonstrou que quando epitélio prostático embrionário de camundongos p63 $-/-$ é transplantado com rUGM (mesênquima urogenital fetal de rato), as células se diferenciam em epitélio secretório. Em contrapartida, Signoretti et al. (2005) utilizando embriões p63 $-/-$ injetados com *stem cells* embrionárias p63 $+/+$ β -galactosidase-positivas

demonstrou, por marcação de β -galactosidase, que 100% das células basais e luminais eram derivadas de células p63^{+/+}, suportando sua idéia inicial de que a p63 é necessária para o desenvolvimento prostático.

Tem sido proposto que os tumores contém raras células com características de stem cells (*stem cells* tumorais), caracterizadas pela capacidade de auto-renovação ilimitada e habilidade de se diferenciarem em células tumorais proliferativas (REYA et al., 2001; TAN et al., 2006). Tem sido hipotetizado também que a forma mais agressiva do carcinoma prostático se origine de *stem cells* p63 positivas (GRISANZIO; SIGNORETTI, 2008).

Assim, a caracterização das lesões neoplásicas quanto aos tipos celulares constituintes e suas alterações constitui o primeiro passo na elucidação da origem tumoral. Além da importância de se caracterizar as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas no cão, este representa um modelo válido para o estudo de afecções prostáticas no homem.

MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

O presente trabalho foi dividido em 4 etapas. A primeira correspondeu à avaliação anatomopatológica (morfologia e histopatologia), a segunda à avaliação imunoistoquímica, a terceira correspondeu à análise da morfometria nuclear e a quarta consistiu dos estudos de biologia molecular (Western blot e PCR quantitativo em tempo real).

3.1 Coleta de próstatas

As próstatas foram coletadas de 44 cães que vieram a óbito provenientes do HOVET, hospital veterinário da FMVZ-USP. Foram registrados peso, idade e raça dos animais, e efetuada a análise dos prontuários destes. As próstatas foram pesadas e amostras das regiões cranial, medial e caudal, contemplando os dois lóbulos, foram colhidas em nitrogênio líquido e posteriormente acondicionadas a -80°C , para posterior realização de Western blot e RT-PCR. Outras amostras representando estas mesmas regiões foram fixadas em metacarn por 12 horas, sendo transferidas para álcool 95% e enviadas ao Laboratório de Histologia deste mesmo Departamento. As próstatas foram cortadas transversalmente a cada 0.5cm, estando representado nas amostras as regiões periférica à periuretral.

As amostras foram incluídas em parafina, cortadas com 5 μm de espessura e coradas pela hematoxilina-eosina (H&E), para o exame histopatológico, e também colhidas em lâmina silanizada, para a realização de imunoistoquímica. Foram realizados cortes seriados do tecido prostático para que áreas de interesse identificadas nas lâminas em H&E, como, por exemplo, áreas de PIN, pudessem ser comparadas com as lâminas utilizadas na imunoistoquímica.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Bioética da FMVZ USP sob o protocolo número 691/2005.

3.2 Imunoistoquímica

Foi realizada imunoistoquímica para marcação do receptor de andrógeno (AR), células basais (p63), conexinas 32 e 43 e para a determinação do índice proliferativo (PCNA). O

anticorpo anti-34 β E12, que marca citoqueratinas de alto peso molecular, foi utilizado complementarmente para a caracterização do epitélio prostático em relação aos ductos prostáticos e células basais.

Para todos os anticorpos, o controle negativo foi realizado substituindo-se o anticorpo primário por imunoglobulinas de mesma classe, conforme ilustra a tabela 1. Como controle positivo das imunoistoquímicas para AR, p63, PCNA e 34 β E12, foram utilizadas secções de próstatas sabidamente positivas para o antígeno de interesse. Como controle positivo das imunoistoquímicas para as conexinas 43 e 32, foram utilizadas secções de testículo de cão e fígado de camundongo, respectivamente.

As hiperplasia complexas e glandulares foram agrupadas em um só grupo.

Tabela 1 - Anticorpos primários e respectivos anticorpos utilizados como controle negativo

Anticorpo primário	Anticorpos -Controle negativo
AR, policlonal de coelho, sc816, Santa Cruz	IgG de coelho, Sc-2027, Santa Cruz
p63, policlonal de coelho, sc-8343, Santa Cruz	IgG de coelho, Sc-2027, Santa Cruz
34 β E12, monoclonal de camundongo, M0630, Dako	IgG1 de camundongo, X0903, Dako
PCNA, monoclonal de camundongo, PC-10, M0879, Dako	IgG1 de camundongo, X0903, Dako
Conexina 43, policlonal de coelho, 71-0700, Zymed	IgG de coelho, Sc-2027, Santa Cruz
Conexina 32, policlonal de coelho, 71-0600, Zymed	IgG de coelho, Sc-2027, Santa Cruz

3.2.1 Receptor de andrógeno

Foi utilizado o anticorpo anti -AR, na diluição de 1:1000 em tampão TNB (fornecido pelo kit). Apesar do material ter sido fixado em metacarn, foi realizado desmascaramento antigênico, pois este permitiu uma marcação mais homogênea dos cortes.

Procedemos à imunomarcacão utilizando o kit TSA (tyramide signal amplification, New Life Science Products®), conforme instruções do fabricante, descrito a seguir:

1. Desparafinização e hidratação do material
Xilol (15 minutos)
Xilol (10 minutos)
Xilol/álcool (5 minutos)
Álcool absoluto (5 minutos)
Álcool absoluto (5 minutos)
Álcool 95% (5 minutos)
Álcool 70% (5 minutos)
H₂O destilada (5 minutos)
2. Desmascaramento antigênico com solução Tris/EDTA (10mM Tris base, 1mM EDTA, 0.05% tween 20, pH 9.0), por 4 seções de 5 minutos em forno de microondas.
3. Lavagens em tampão PBS contendo 0,05% de tween 20 (3x).
4. Bloqueio da peroxidase endógena, utilizando solução de H₂O₂ 30% e metanol (20v/80v, respectivamente), por 30 minutos.
3. Lavagens em tampão PBS contendo 0,05% de tween 20 (3x).
4. Imersão em tampão de bloqueio (TNB) fornecido pelo kit, por 30 minutos.
5. Incubação com anticorpo primário, *overnight*, em câmara úmida a 4^o C
6. Lavagens em tampão PBS contendo 0,05% de tween (3x).
7. Incubação com anticorpo secundário goat anti-rabbit (DAKO®, EO432) na diluição de 1:500 em TNB por 60 minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente.
8. Lavagens em tampão PBS contendo 0,05% de tween (3x).
9. Incubação com o complexo estreptavidina-peroxidase (fornecida pelo kit), na diluição de 1:100 em TNB por 30 minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente.
10. Lavagens em tampão PBS contendo 0,05% de tween (3x).
11. Incubação com o reagente de amplificação tiramida, diluído a 1:50 no diluente de amplificação (fornecido pelo kit), por 10 minutos, à temperatura ambiente.
12. Lavagens em tampão PBS contendo 0,05% de tween (3x).
13. Incubação com anticorpo antilfluoresceína HRP-conjugado (Perkin Elmer®, NEF710) na diluição de 1:25 em TNB, por 30 minutos, à temperatura ambiente.
14. Lavagens em tampão PBS contendo 0,05% de tween (3x).

15. Aplicação de solução de diaminobenzidina (Chromogen System, DAKO®, k3468) sobre os cortes, por 1 minuto.
16. Bloqueio da reação mergulhando as lâminas em água destilada.
17. Contracoração com hematoxilina, por 1 minuto, desidratadação, diafanização e montagem com resina sintética e lamínula.

Todas as lâminas submetidas à marcação para o AR foram analisadas qualitativamente em microscópio Nikon Eclipse E-800 quanto à intensidade de marcação, atribuído-se um score de 0 a +3 (0= marcação de AR ausente; 1+= discreta; 2+=moderada; 3+=intensa).

3.2.2 PCNA, p63 e 34βE12

Foram utilizados: 1) anticorpo anti- p63, na diluição de 1:100; 2) anticorpo anti-34βE12, na diluição de 1:100; 3) anticorpo anti-PCNA, na diluição de 1:800.

Os anticorpos foram diluídos em solução de azida e albumina (0.5 mL de azida sódica a 5% e 0.25mL de albumina bovina em 12 mL de PBS).

O desmascaramento antigênico para a marcação de 34βE12 e p63 foi realizado utilizando-se solução Tris/EDTA (10mM Tris base, 1mM EDTA, 0.05% tween 20, pH 9.0), por 4 seções de 5 minutos em forno de microondas. O desmascaramento para a marcação do PCNA foi realizado utilizando-se tampão citrato a 0.01M (solução de ácido cítrico a 0.01M em PBS e solução de citrato de sódio a 0.01M em PBS, 1:4, respectivamente, pH = 6.0), por 12 minutos em forno de microondas.

Foi realizada a metodologia preconizada por Hsu et al. (1981), descrita a seguir:

1. Desparafinização e hidratação do material, utilizando a mesma seqüência de reagentes e tempos descritos para a imunoistoquímica do AR.
2. Desmascaramento antigênico.
3. Bloqueio da peroxidase endógena, utilizando solução de H₂O₂ 30% e metanol (20v/80v, respectivamente), por 30 minutos.
4. Lavagens em tampão PBS (3x).
5. Bloqueio de sítios inespecíficos utilizando-se leite a 5% em PBS, por 30 minutos.
6. Incubação com anticorpo primário, *overnight*, em câmara úmida a 4⁰ C.

7. Lavagens em tampão PBS (3x).
8. Incubação com anticorpo secundário, sendo utilizado o *kit* LSAB, conforme instruções do fabricante.
9. Lavagens em tampão PBS (3x).
10. Aplicação de solução de diaminobenzidina (Chromogen System, DAKO® k3468) sobre os cortes, por 1 minuto
11. Bloqueio da reação mergulhando as lâminas em água destilada.
12. Contracoração com hematoxilina, por 1 minuto, desidratadação, diafanização e montagem com resina sintética e lamínula.

A expressão do PCNA e p63 foi avaliada como a porcentagem de núcleos positivos para os respectivos anticorpos, sendo desconsiderados os núcleos que apresentavam marcação discreta. Ao menos 400 células de focos de PIN ou 1000 células provenientes de 8 áreas aleatoriamente escolhidas de próstatas normais, hiperplásicas ou neoplásicas, utilizando objetiva de 40x, foram avaliadas para cada amostra. Foram avaliadas 6 próstatas normais, 7 hiperplásicas, 2 neoplásicas e 5 apresentando PIN.

3.2.3 Conexinas 32 e 43

Foram utilizados os anticorpos anti-Cx43 e anti-Cx32, ambos na diluição de 1:1000.

Procedemos à imunomarcação utilizando o kit TSA (tyramide signal amplification, New Life Science Products®).

As etapas de 1 a 12 foram idênticas às da imunoistoquímica para o AR. Após a etapa 12, porém, as lâminas foram incubadas com iodeto de propídeo (PI), na diluição de 10 /mL, em tampão PBS, por 10 minutos, acrescidas de 10µL de Vectashield (Vector®). A obtenção das imagens foi realizada em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência.

3.3 Morfometria nuclear – área nuclear

As áreas nucleares de próstatas normais, hiperplásicas, pré-neoplásicas e neoplásicas foram mensurados nas lâminas coradas em HE, utilizando-se o sistema de análise de imagens *Image Pro-plus*, versão 4.5. Foram avaliadas 6 próstatas normais, 7 hiperplásicas, 5 apresentando PIN e 2 neoplásicas. Para cada próstata, foram selecionados pelo menos 5 campos (objetiva de 40x) para a realização da morfometria, sendo avaliados pelo menos 500 núcleos por próstata.

A metodologia foi realizada de acordo com de Andréa et al. (2008), com algumas modificações. Foram selecionados todos os núcleos (núcleos de células acinares e de células estromais) presentes em cada campo utilizando-se o recurso máscara de cor, selecionando-se o pixel mais predominante no núcleo. A cor predominante é selecionada e, portanto, indicada como objeto a ser quantificado pelo sistema, o qual calcula e fornece a área total (Figura 1).

Figura 1- Interface do programa de análise de imagens *Image Pro plus*, mostrando a seleção colorimétrica das áreas nucleares (em vermelho), após definição prévia da cor a ser analisada.

Em um mesmo campo, onde os núcleos das células estromais e epiteliais foram selecionados, foi utilizado o recurso de seleção manual, onde a área correspondente aos núcleos das células estromais foi desenhada (Figura 2, linha verde), indicando ao sistema qual região deveria ser mensurada, obtendo-se o valor da área nuclear estromal.

Figura 2- Área dos núcleos de células estromais definida manualmente (contorno verde), a fim de se subtrair o valor da área nuclear estromal da área nuclear total

Do valor da área total, subtraiu-se a área correspondente aos núcleos das células estromais, obtendo-se o valor da área nuclear das células acinares. Dividiu-se este valor resultante pelo número de núcleos de células acinares presentes nesse mesmo campo (Figura 3), obtendo-se a área média nuclear.

Figura 3- Núcleos das células acinares quantificados manualmente (quantificação em vermelho)

3.4 Western blot para a conexina 43

Para a quantificação da Cx 43, aproximadamente 40mg de tecido foi submetido à lise celular para extração das proteínas totais. Todas as etapas foram realizadas com as amostras mantidas no gelo.

Inicialmente, os fragmentos de tecido foram triturados em tubos de vidro com 400 µl de *sample buffer* (Tris-HCl 1M, pH 6,8; contendo SDS 10% e glicerol 20%), no homogeneizador de tecidos Tissue Teator[™]. Após, foi adicionado 400 µl de *working solution* (Tris-HCl 1 M, pH 6,8; contendo SDS 10%, glicerol 20%, DTT 100mM e PMSF 1mM), e as amostras foram novamente trituradas. O material foi transferido para tubo plástico e centrifugado durante 15 minutos, 13.000 rpm e 4°C. O pellet foi descartado e o sobrenadante foi armazenado em freezer à -20°C.

A concentração de proteínas totais no tecido foi quantificada pelo método de Bradford, com o reagente BioRad Protein Assay (Bio-Rad Labs®). Foram utilizadas diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA, Sigma) para criação de uma curva de calibração para o aparelho de espectrofotometria (Eppendorff).

Na eletroforese, foram utilizadas 125µg de proteína/poço, acrescida de azul de bromofenol. As proteínas foram dissociadas em gel de poliacrilamida a 13,5%. A eletroforese foi realizada a 100V por um período de 2h30min.

Todas as corridas foram acompanhadas do marcador de peso molecular Kaleidoscopio padrão pré-corado (Bio-Rad Labs®). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Tans-Blot SD cell; Bio-Rad Labs®), a 47mA, durante 45 min. Anterior a transferência, a membrana de PVDF foi previamente umedecida em metanol, por 10 minutos, e em água destilada por 5 minutos.

Após a transferência, as membranas foram incubadas em leite desnatado (*skim milk*) 5%, diluído em TTBS, por 2 horas sob leve agitação à temperatura ambiente. Após 3 lavagens em TTBS, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário, *overnight* e a 4° C. O anticorpo foi diluído em TTBS com 5% de *skin milk*, na titulação de 1:500.

No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes de 10 minutos cada, em TTBS, e incubada com o anticorpo secundário diluído em TTBS com 5% de *skin milk*, na titulação de 1:500, por 2 horas e em temperatura ambiente. A revelação da imunomarcação nas membranas foi efetuada com uma solução de DAB-níquel, acrescida de 20µl de peróxido de

hidrogênio a 30%. Após a visualização das bandas de interesse, as membranas foram mergulhadas em água destilada para o bloqueio da reação.

Para cada anticorpo, a técnica foi realizada em duplicata, por 2 vezes no mínimo.

3.5 Extração de RNA

A extração de RNA da próstata foi realizada com o *kit* para extração de RNA - *RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE®). Cerca de 30 mg de tecido prostático foi adicionado em 350 µl da solução de lise RA1 do *kit*, acrescido de 3,5 µl de β-mercaptoetanol, sendo macerado com o auxílio de um pistilo autoclavado e RNase-free. O macerado celular foi transferido para colunas de extração, seguindo o protocolo determinado pelo fabricante do *kit* de extração. O processo consiste basicamente na purificação do RNA através de colunas de sílica com afinidade às moléculas de RNA, descartando as outras moléculas celulares. Na etapa final 50µL de reagente promove a liberação e eluição do RNA da coluna, o qual foi mantido em freezer -80°C até o momento do uso.

3.6 Quantificação do RNA total

Uma alíquota de 10µl foi retirada para quantificação e verificação da integridade do RNA. A análise qualitativa foi realizada submetendo-se as amostras a eletroforese em gel de agarose 1,5% diluída em TAE 1X Rnase free (48,4g de Tris base; 20ml de EDTA 0,5M, pH 8,0; 11,4mL de Ácido Acético; H₂O MilliQ autoclavada q.s.p. 1000mL), 60V, por 1,5 hora. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5mg/mL em H₂O destilada) para a visualização das bandas 28S e 18S em luz UV. A correta identificação destas bandas indica a qualidade do RNA.

A quantificação foi realizada em biofotômetro (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) a 260/280 nm. Amostras num range de 1.7 até 2.0 indicam baixa contaminação do RNA, sendo consideradas de boa qualidade para a transcrição reversa.

3.7 Transcrição Reversa

Para eliminar quaisquer resquícios de DNA, o RNA total foi tratado com DNase I. Foi utilizado 1 µl de DNase I para cada 3 µg de RNA total. Os *eppendorfs* foram mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos, sendo adicionado 2 µl de EDTA (25mM) para bloquear a ação da enzima e aquecidos por 10 minutos a 65°C em banho seco seguido de resfriamento em banho de gelo. As amostras receberam 1 µl de Oligo DT, 1 µl de dNTPs (mix 10mM-2,5mM de cada dNTP) e posteriormente foram incubadas a 65°C por 5 minutos e resfriadas em gelo. Ainda no gelo foram adicionados a cada tudo 4 µl de *first strand buffer*, 2 µl de DTT 0.1M e 1 µl de *RNAse OUT* (5000UI), incubando-se por 2 minutos a 42°C e resfriadas no gelo. Foi acrescido 1µl da enzima de transcrição reversa *superscript II* (10000U), permanecendo incubado a 42°C, por 50 minutos e em seguida por 70°C por 15 minutos e resfriada no gelo. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até o momento da amplificação do cDNA. Todos os reagentes foram fornecidos pela *Invitrogen Life Technologies*.

3.8 qPCR para receptores de andrógeno

A quantificação por PCR em tempo real do gene receptor de andrógeno foi realizada utilizando o gene hipoxantine como controle endógeno da reação. Foi utilizado sistema de detecção ABI Prism 7000 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA) que contém uma câmera CCD acoplada que captura a fluorescência emitida e analisa os dados utilizando um programa de detecção. Para avaliação da expressão foram colocados em tubos apropriados (*Optical Tubes Applied Biosystems*) 1 µL cDNA, tampão A TaqMan 1X, MgCl₂ 5.5 mM, 200 nM de dATP/dCTP/dGTP, 400mM dUTP, 200 nM dos *primers* (senso e antisenso), 100 nM das *probes* TaqMan, 0.01U/mL de *AmpErase* e 0.025 U/µl da DNA polimerase *AmpliTaQ Gold* em um volume total de 25µl. Após completa mistura dos reagentes cada tubo foi fechado com tampas *MicroAmp Optical* (*Applied Biosystems*). Todas as reações foram corridas em duplicata. As condições de amplificação utilizadas foram: 2 minutos a 50° C, 10 minutos à 95° C; seguidos de 40 ciclos a 90°C por 15 segundos para desnaturação da fita de cDNA e a 60° C por 1 minuto para sua extensão. A interpretação dos resultados foi realizada conforme

descrito pelo método comparativo de Livak et al. (2001) onde a expressão relativa dos genes corresponde a $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Os primers foram adquiridos da empresa Applied Biosystems, e seus respectivos IDs estão descritos no quadro abaixo:

GENES	ASSAY ID
Androgen receptor	Cf 02623884_m1
hypoxantine	Cf 02690456_g1

Quadro 1 - *Primers* utilizados para análise da expressão gênica por PCR em tempo real.

Foram avaliadas 12 próstatas (2 próstatas provenientes de animais castrados, 2 apresentando neoplasia e PIN, 1 apresentando hiperplasia e PIN, 5 hiperplásicas e 2 próstatas normais).

3.9 Análise estatística

Para a comparação da área nuclear média e porcentagem de células p63 e PCNA positivas entre os grupos foi utilizado o teste t de Student, para dados paramétricos, ou o teste de Mann-Whitney, para dados não paramétricos, utilizando o software Graphpad Prisma 5.0. Foram considerados significantes valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados são apresentados em segmentos distintos conforme apresentado em “material e método”. As análises estatísticas se fundamentaram em agrupamentos constituídos a partir da classificação histológica das próstatas, sendo eles: grupo “ácinos normais”; grupo “ácinos hiperplásicos” e grupo “PIN”. As neoplasias foram excluídas da análise estatística por não apresentarem número adequado de repetições para compor um grupo comparativo.

4.1 Avaliação histológica

Foram coletadas e avaliadas 44 próstatas de cães entre 2 meses a 16 anos de idade. A tabela 2 apresenta a distribuição das afecções segundo idade, peso relativo da próstata e raça. Quatro cruces representam um escore onde se observou um grande acometimento tecidual pela afecção citada, e nenhuma cruz, ausência da afecção.

Tabela 2 – Afecções prostáticas conforme idade, peso relativo (PR) da próstata e raça – São Paulo

(Continua)

Animal	Idade	PR (g/Kg)	Raça	Infiltrado inflamatorio	Hiperplasia	Atrofia	PIN	Neoplasia
1	9a	-	Poodle					
2	7a	1,09	Pinscher					
3	2a	-	SRD					
4	2m	-	SRD					
5	2m	-	SRD					
6	-	1.19	-					
7	-	0.75	Fila Brasileiro					
8	-	-	Poodle					
9	-	-	SRD					
10	-	-	Cocker Spaniel					
11	8a	0.94	Pastor Belga					
12	7a	-	Pastor alemao					
13	13a	-	Pastor alemão	++++				
14	15a	2,17	Weimaraner	++++				
15	-	1,01	SRD	++++				
16	11a	1.31	SRD	++++				
17	10a	-	SRD	++++				
18	-	-	Poodle	+++				
19	-	1,07	SRD	+++				
20	9a	0.73	Poodle	+++				
21	12a	-	Fox Terrier	+++				
22	-	-	Cocker Spaniel	++				
23	9a	0.73	Poodle	++				
24	7a	1,86	Labrador	++++	+++ Complexa			

Tabela 2 – Afecções prostáticas conforme idade, peso relativo (PR) da próstata e raça – São Paulo

(Continua)

Animal	Idade	PR (g/Kg)	Raça	Infiltrado inflamatorio	Hiperplasia	Atrofia	PIN	Neoplasia
25	5a	-	SRD	+++	+++ Complexa			
26	-	2,77		++	+++ Complexa		+	
27			Boxer	++	+++ Complexa		+	
28	7 ^a	1.74	SRD		+++ Complexa		+	
29	13a	1.26	SRD	+++	++ Complexa			
30	11a	1.08	Setter Irlandês	++	+ Complexa			
31	9a	2,20	SRD		+++ Glandular			
32	9a	1,80	Pastor alemão		+++ Glandular			
33	8a	3,67	Poodle		+++ Glandular			
34	7a	1,54	Pastor alemão		++ Glandular			
35	12a	0.34	Schanuzer	++		++++		
36	4a	0,49	SRD	++		++++ (castrado)		
37	-	0.28	Poodle			++++		
38	8a	0,36	Pastor alemão			++++		
39	3a	0,34	Bassethound			++++ (castrado)		
40	-	-	Poodle			+++		
41	-	0.67		+++		++		
42	13a	0,58	Cocker Spaniel			+		
43	-	0,98	Poodle				+	+
44	16a	0,26	Pastor alemão				+	+

++++ a +: maior a menor intensidade

Próstatas normais, infiltrado inflamatório, HPB, atrofia, PIN e neoplasia corresponderam a 27.27, 45.45, 25, 18.18, 11.36 e 4.54% dos casos, respectivamente, conforme ilustra a figura 3.

Figura 4- Porcentagem das afecções prostáticas observadas. Mais de uma afecção foi observada em uma única próstata

4.1.1 Próstata normal

A próstata normal apresentou-se como um órgão bilobulado, composto por uma porção glandular e outra estromal, circundando a uretra prostática (Figura 5). Foram observadas células basais e luminais compondo o epitélio acinar, sendo as células luminais (secretoras) cúbicas a colunares (Figuras 6 e 7). As células basais estavam presentes de forma esporádica, resultando na formação de um epitélio duplo (Figura 7). Os ductos principais apresentavam epitélio de transição (Figura 8).

Figura 5- Fotomicrografia de próstata normal, composta por porção estromal (seta preta) e porção glandular (seta vazada), circundando a uretra prostática (seta vermelha). HE. Barra de escala = 40µm.

Figura 6- Fotomicrografia de próstata normal. A) Notar presença de tecido conjuntivo entre os ácinos. HE. Barra de escala = 100µm. B) Detalhe de A, evidenciando diversos ácinos formados principalmente por células luminiais cúbicas a colunares. HE. Barra de escala = 20µm

Figura 7- Fotomicrografia de próstata normal. A) Notar presença de célula basal abaixo das células luminais (seta). HE. Barra de escala = 10µm. B) Notar projeção digitiforme (seta) em direção ao lúmen e secreção (seta cheia) pelas células luminas. HE. Barra de escala = 10µm

Figura 8- Ducto prostático, apresentando epitélio de transição. HE. Barra de escala = 20µm

4.1.2 Infiltrado inflamatório

Infiltrado inflamatório agudo e/ou crônico, discreto a intenso, esteve presente em quase metade das próstatas avaliadas.

O infiltrado inflamatório agudo caracterizou-se pela presença de células predominantemente polimorfonucleares, principalmente no interior dos ácinos (Figura 9). O infiltrado inflamatório crônico caracterizou-se pela presença de células mononucleares, principalmente linfócitos (Figura 9). O epitélio prostático apresentou-se atrófico e seu citoplasma perdeu sua característica eosinofílica.

Em 2 próstatas avaliadas, foram observados folículos linfóides, com componente glandular escasso (Figura 10).

Figura 9- Infiltrado inflamatório agudo (A) e crônico (B). A) Infiltrado predominantemente polimorfonuclear no interior de ácino. Notar presença de macrófagos (seta) em tecido conjuntivo. HE. Barra de escala = 20µm. B) Infiltrado inflamatório mononuclear em tecido conjuntivo, composto principalmente por linfócitos. HE. Barra de escala = 20µm

Figura 10- Infiltrado inflamatório crônico, com presença de folículos linfóides (seta) e componente glandular escasso (seta cheia). HE, objetiva 0.5x

4.1.3 Hiperplasia prostática benigna

Na HPB do tipo glandular foram observados inúmeras projeções papilares e aumento do epitélio secretório acinar (Figura 11). As células luminais eram colunares e ocasionalmente apresentavam-se hipertrofiadas.

Na HPB do tipo complexa foi observada hiperplasia glandular juntamente a ácinos císticos e atróficos; nas áreas contendo ácinos císticos e atróficos observou-se um aumento absoluto ou relativo de estroma fibromuscular (Figura 11).

Figura 11- Hiperplasia prostática benigna. A) HPB glandular. Notar lúmen repleto de projeções papilares. HE. Barra de escala = 20 μ m. B) HPB complexa. Notar áreas de hiperplasia glandular (seta cheia) e áreas contendo ácidos císticos (seta vazada) envolvidos por estroma abundante. HE. Barra de escala = 100 μ m

4.1.4 Atrofia

Atrofia glandular difusa foi observada em 8 animais, sendo 2 castrados. A atrofia glandular era caracterizada por epitélio glandular pouco desenvolvido e maior quantidade de estroma em relação a tecido glandular (Figura 12).

Figura 12- Atrofia glandular. Observar ácinos atróficos em meio a estroma bem desenvolvido. HE. Barra de escala = 20 μ m

4.1.5 Neoplasia intraepitelial prostática

Focos de proliferação em epitélio celular de ductos e ácinos pré-existent, com aglomeração celular, foram observadas nas PINs (Figura 13). Pleomorfismo discreto a moderado, caracterizado por atipias citológicas, como aumento e variação do formato nuclear estavam presentes (Figura 14). Os núcleos eram redondos a ovais, apresentando ocasionalmente pequenos nucléolos evidentes. Macrófagos eram freqüentemente observados no lúmen acinar acompanhando estas lesões.

Figura 13- Neoplasia intraepitelial prostática. Notar proliferação e desorganização celular em ácino. HE. Barra de escala = 40µm

Figura 14- A e B) Neoplasia intraepitelial prostática. Note epitélio proliferativo apresentando células exibindo atipias citológica, como aumento nuclear. HE. Barra de escala = 10µm

4.1.6 Adenocarcinoma

Foram encontrados 2 adenocarcinomas entre os 44 animais estudados. Os adenocarcinomas eram compostos predominantemente por inúmeros pequenos ácinos, juntamente com ácinos normais, em meio a um estroma bem desenvolvido (Figura 15). Em um dos casos, foi observada infiltração neural pelas células neoplásicas.

Observou-se ácinos solitários, ácinos fundidos e ninhos de células neoplásicas formando estruturas semelhantes a ácinos (Figura 16). As células eram claras, com uma diminuição de eosinofilia, apresentavam uma maior relação núcleo/citoplasma e algumas apresentavam nucléolos evidentes (Figura 16). Discreto infiltrado inflamatório mononuclear também foi observado. Concomitantemente aos 2 adenocarcinomas, foram encontrados focos de PIN em ambas as próstatas.

Figura 15- Adenocarcinoma prostático. Notar inúmeros ácinos neoplásicos (seta vazada) juntamente a ácinos normais (seta) em meio a um estroma bem desenvolvido. HE. Barra de escala = 40 μ m

Figura 16- Adenocarcinoma prostático. A) Ácinos fundidos. Notar alteração do arranjo acinar e redução da luz dos mesmos, além da perda da eosinofilia. HE. Barra de escala = 20 μ m. B) Ninho de células neoplásicas. Notar maior relação núcleo/citoplasma nas células neoplásicas e alguns nucléolos evidentes, além da perda da eosinofilia. HE. Barra de escala = 10 μ m

4.2 Imunoistoquímica

Os resultados das imunoistoquímicas para o receptor de andrógeno, p63, citoqueratina de alto peso molecular 34 β E12, PCNA e conexinas 32 e 43 são apresentados a seguir.

4.2.1 Receptor de andrógeno

Os núcleos de células luminais secretórias (>95%) de ácinos benignos (normais ou hiperplásicos) apresentaram marcação intensa (+3) de AR e a maioria das células basais apresentaram marcação moderada (+2) a intensa (+3), com uma pequena porcentagem exibindo marcação ausente a discreta (0 to +1), como mostra a figura 17. As células estromais apresentaram marcação ausente, moderada ou intensa (Figura 17). Foi observada marcação também em urotélio (Figura 18) e ductos prostáticos.

Figura 17- Expressão nuclear de AR em ácino normal. Marcação intensa evidente em células luminais e marcação intensa (A), discreta (B) ou ausente (C) das células basais (setas). C) Notar célula estromal exibindo marcação para o AR (seta vazada). Estreptavidina-peroxidase com amplificação pela tiramida e revelação com DAB. Barra de escala = 10µm

Figura 18- Urotélio prostático. Observar marcação nuclear moderada a intensa de AR em células uroteliais. Imunofluorescência com amplificação pela tiramida e revelação com DAB. Barra de escala = 40 μ m

As células da PIN exibiram marcação heterogênea: a marcação foi discreta (+1) a moderada (+2) na maioria das células, com poucas (< 35%) apresentando marcação intensa (Figura 19). Células neoplásicas apresentaram marcação heterogênea, variando de moderada (+2) a intensa (+3) na maioria das células (>95%), conforme ilustra a figura 20.

Figura 19- Expressão nuclear de AR em neoplasia intraepitelial prostática. A maioria das células apresentou intensidade de marcação discreta a moderada. Estreptavidina-peroxidase com amplificação pela tiramida e revelação com DAB. Barra de escala = 10 μ m

Figura 20- Adenocarcinoma prostático. Observar marcação nuclear moderada a intensa de AR em células neoplásicas. Imunofluorescência com amplificação pela tiramida e revelação com DAB. Barra de escala = 10 μ m

4.2.2 p63

Ácinos normais e ductos apresentaram marcação nuclear na camada basal, formando uma camada descontínua (Figura 21). Por outro lado, no urotélio foi observada marcação na camada de células basais de forma contínua.

Figura 21- A) Expressão de p63 em ácino normal. Observe os núcleos positivos formando uma camada descontínua ao redor dos ácinos. Estreptavidina-peroxidase. Barra de escala = 10 μ m. B) Expressão de p63 em ducto. Observe os núcleos positivos formando uma camada descontínua ao redor dos ácinos. Estreptavidina-peroxidase. Barra de escala = 10 μ m

As PINs apresentaram uma maior quantidade de núcleos positivos (Figura 22); a porcentagem de núcleos positivos foi significativamente maior (23.99 ± 8.78) comparada a exibida pelos ácinos normais (7.20 ± 3.36 , $p=0.0018$) ou hiperplásicos (6.58 ± 2.29 , $p=0.0025$). Não houve diferença na porcentagem de núcleos positivos entre os ácinos normais e hiperplásicos.

Os 2 adenocarcinomas também apresentaram uma maior quantidade de núcleos positivos (Figura 23), sendo a porcentagem de 25,99% em um dos carcinomas e de 29,13% no outro carcinoma.

Figura 22- Expressão de p63 em neoplasia intraepitelial prostática. Notar vários núcleos p63 positivos. Estreptavidina-peroxidase. Barra de escala = 10 μ m

Figura 23- Expressão nuclear de p63 em adenocarcinoma prostático. Notar várias células neoplásicas p63 positivas. Estreptavidina-peroxidase. Barra de escala = 10 μ m

4.2.3 Citoqueratina de alto peso molecular 34 β E12

Ácinos normais apresentaram marcação citoplasmática em camada basal, formando uma camada descontínua (Figura 24); já urotélio e ductos apresentaram todas as células marcadas (Figura 24). Ao contrário do observado com a marcação para p63, os ductos apresentaram maior marcação de células basais ao se utilizar o anticorpo para o 34 β E12.

Em ácinos que apresentavam tanto células colunares quanto células pavimentosas, principalmente ácinos dilatados, pôde-se observar que as células pavimentosas eram positivas para esta citoqueratina (Figura 25).

As PINs apresentaram marcação citoplasmática positiva (Figura 26); a quantidade de células positivas era maior em relação aos ácinos normais ou hiperplásicos, semelhantemente à marcação pelo p63.

Nos adenocarcinomas também foi observada uma maior quantidade de células marcadas, semelhantemente à marcação pelo p63 (Figura 27).

Figura 24- Expressão de 34βE12 em próstata normal. A) Marcação citoplasmática de 34βE12 células basais de ácinos normais, formando uma camada descontínua. Estreptavidina-peroxidase. Barra de escala = 10μm. B) Marcação citoplasmática de 34βE12 em urotélio em todas as camadas. Estreptavidina-peroxidase. Barra de escala = 10μm. C) Marcação citoplasmática de 34βE12 em ducto em todas as camadas. Estreptavidina-peroxidase. Barra de escala = 10μm

Figura 25- Ácino prostático dilatado. Observar marcação citoplasmática de 34βE12 em células pavimentosas (seta). Estreptavidina-peroxidase. Barra de escala = 40μm

Figura 26- Neoplasia intraepitelial prostática. Observar marcação citoplasmática de 34βE12 em várias células desta lesão. Estreptavidina-peroxidase. Barra de escala = 20μm

Figura 27- Adenocarcinoma prostático. Marcação citoplasmática de 34βE12 em células neoplásicas. Estreptavidina-peroxidase. Barra de escala = 10μm

4.2.4 PCNA

Foi observada marcação nuclear em células acinares, células estromais (fibroblastos), células uroteliais, células de PIN e em células neoplásicas.

Em próstatas normais e hiperplásicas, observou-se marcação de células basais pouco frequente, ao contrário das PINs, que apresentaram maior marcação (Figura 28). O índice proliferativo foi significativamente maior em PIN ($11.63 \pm 6.41\%$) em relação aos ácinos normais ($3.92 \pm 2.51\%$, $p = 0.023$) ou hiperplásicos ($1.83 \pm 0.47\%$, $p = 0.0025$). Não houve diferença na porcentagem de núcleos positivos entre os ácinos normais e hiperplásicos.

Os 2 adenocarcinomas apresentaram uma maior quantidade de núcleos positivos para o PCNA (Figura 29), nas porcentagens de 8.59 e 17.37%.

Figura 28- Expressão nuclear de PCNA. A) Ácino normal. Note poucas células PCNA-positivas. Estreptavidina-peroxidase. Barra de escala = 10 μ m. B) Neoplasia intraepitelial prostática com várias células PCNA-positivas. Estreptavidina-peroxidase. Barra de escala = 10 μ m

Figura 29- Adenocarcinoma prostático apresentando várias células PCNA positivas. Estreptavidina-peroxidase. Barra de escala = 10 μ m

4.2.5 Conexinas 43 e 32

Não foi observada marcação das conexinas 43 ou 32 no epitélio glandular prostático, tanto em epitélio benigno quanto nas PINs ou neoplasias. Utilizando a mesma metodologia, como controle positivo da reação, obteve-se a marcação da Cx43 em testículo de cão (células de Leydig e células de Sertoli) e da Cx32 em fígado de camundongo.

4.3 Morfometria nuclear

A área nuclear média das células das PINs ($36.26\mu\text{m}^2 \pm 5.24$) foi significativamente maior em relação à área nuclear média dos ácinos normais ($28.61\mu\text{m}^2 \pm 4.15$, $p=0.024$) ou hiperplásicos ($28.75\mu\text{m}^2 \pm 4.04$, $p=0.018$). Não houve diferença na área nuclear média entre os ácinos normais ou hiperplásicos. Nos 2 adenocarcinomas, a área nuclear média foi de $40.6\mu\text{m}^2$ e $36.05\mu\text{m}^2$.

4.4 Western blot para a conexina 43

Não foram observadas bandas nas próstatas avaliadas, de acordo com os resultados da imunoistoquímica. Foram observadas bandas na altura de 43KDa em coração de camundongo e coração de cão, utilizados como controles positivos da reação, conforme ilustra a Figura 30.

Figura 30- Western blot para a Cx43, onde m=marcador de peso molecular; 1 = coração de cão utilizado como controle positivo e 2 = coração de camundongo utilizado como controle positivo. Foram utilizadas próstatas normais e próstatas apresentando diferentes afecções: 3 = próstata de animal de 2 meses de idade; 4 e 5 = normais; 6 = atrófica (castrado); 7 = normal; 8 = HPB complexa/PIN; 9 = atrófica. Notar ausência de bandas na altura de 43KDa nas próstatas avaliadas

4.5 Expressão de AR

Foi escolhida a concentração de 50ng de AR cDNA para a quantificação da expressão de AR por PCR em tempo real, após análise das curvas de calibração (Figura 31). As curvas de padronização de eficiência dos primers para o receptor de andrógeno e para o controle endógeno hipoxantina estão ilustradas nas figuras 32 e 33, respectivamente:

Figura 31- Curva de calibração. Estão presentes curvas de amplificação refletindo diferentes quantidades iniciais de cDNA para o receptor de andrógeno (12.5; 25; 50; 100 e 200 ng de cDNA). Ct = cycle threshold (ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial)

Figura 32- Curva de padronização de eficiência do primer receptor de andrógeno. A inclinação e a alta linearidade ($R^2 = 0.98$) estão demonstradas ao lado direito da curva

Figura 33- Curva de padronização de eficiência do primer hipoxantina. A inclinação e a alta linearidade ($R^2=0.98$) estão demonstradas ao lado direito da curva

Próstatas normais e hiperplásicas apresentaram maior expressão de AR em relação a próstatas de animais castrados, utilizadas como padrão, com exceção de 2 hiperplásicas e 1 neoplásica/PIN, que apresentaram menor expressão de AR (Figura 34). As neoplasias e/ou PIN mostraram valores variáveis de AR (Figura 34). As curvas estão representadas na figura 35.

Figura 34- Expressão de AR em próstatas hiperplásicas com PIN (HPB/PIN), hiperplásicas (HPB), normais (N) e neoplásicas com PIN (Neo/PIN), utilizando próstatas de animais castrados como padrão (expressão = 1)

Figura 35- Quantificação da expressão de AR pela PCR em tempo real, normalizadas com a utilização do controle endógeno hipoxantina. Para cada amostra os testes foram realizados em duplicadas

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Prevalência das afecções prostáticas

As alterações prostáticas são freqüentes em cães idosos, apesar do exame clínico da próstata não ser realizado rotineiramente em muitos centros clínicos veterinários. Foram observadas alterações em 32 (72.72%) das 44 próstatas estudadas, sendo que 20 (45.45%) apresentavam infiltrado inflamatório, 11 (25%) hiperplasia prostática benigna, 8 (18.18%) atrofia, 5 (11.36%) PIN e 2 (4.54%) neoplasia. Amorim (2001), em estudo recente, também relata como afecções freqüentes a HPB e as prostatite, sendo a PIN e a neoplasia de ocorrência mais rara. Teske et al. (2002) também relata a HPB e a prostatite como as afecções mais freqüentes.

A alteração mais freqüentemente observada foi o infiltrado inflamatório, focal ou disseminado. Na maioria dos casos, infiltrado inflamatório crônico e agudo foram observados concomitantemente, sendo os mesmos focais ou disseminados. Utilizamos o termo infiltrado inflamatório, pois não é possível saber se os infiltrados descritos neste estudo são decorrentes de agentes bacterianos. Sabe-se que em humanos a prostatite crônica não-bacteriana é mais freqüente que a prostatite bacteriana (CLEMENS et al., 2005). Oliveira et al. (2007) relata ausência de bactérias nos fragmentos de próstata canina apresentando prostatite, utilizando método de Gram, sugerindo que estas sejam prostatites não bacterianas.

Krawiec e Heflin (1992) e Oliveira et al. (2007) também referem a prostatite como a afecção mais comum; muitos trabalhos, no entanto, referem a HPB como a afecção mais freqüente (POULET, 1985; JOHNSTON et al., 2000; AMORIM, 2001; DI SANTIS, 2003). Diferenças nas populações estudadas podem explicar essas diferenças na prevalência de prostatites e HPB.

As hiperplasias, encontradas em 11 (25%) dos animais, foram principalmente do tipo complexa. Observamos infiltrado inflamatório concomitantemente à hiperplasia em 6 (54%) dos 11 casos. Neste contexto, Mahapokai et al. (2001) relata que o infiltrado inflamatório é freqüentemente observado concomitantemente a BPH, porém há controvérsias se o processo de

prostatite precede as alterações hiperplásicas ou vice-versa. Amorim (2001) e Di Santis (2003) também observaram infiltrado inflamatório freqüentemente associado à HPB.

Atrofia glandular foi encontrada em 8 animais idosos, de 8 a 13 anos de idade, sendo 2 animais castrados, de 3 e 4 anos. Sabe-se que a atrofia ocorre após castração e em idade avançada, podendo ocorrer também concomitantemente à inflamação crônica.

A PIN foi encontrada em 5 dos 44 animais (11.36%): 3 cães apresentavam simultaneamente hiperplasia complexa e PIN e 2 apresentavam PIN e neoplasia. Esta prevalência é menor que a relatada por Waters e Bostwick (1997), que demonstraram que esta lesão está presente em 55% das próstatas de cães normais idosos. Novamente, as diferenças encontradas em relação à prevalência de PIN podem ser devido a diferenças nas populações estudadas. Neste contexto, Aquilina et al. (1998) relata uma prevalência menor de PIN, de 3%, em cães militares; essa menor prevalência pode ser devido ao fato desses animais não compartilharem os mesmos fatores ambientais que os humanos.

Por outro lado, Tan et al. (2006) mostram que a prevalência de HGPIN em asiáticos é comparável à dos ocidentais, ao contrário do adenocarcinoma prostático clinicamente detectável, que é menos freqüente nos asiáticos (RUIJTER et al., 1999). Este fato sugere que fatores ambientais não influenciam no surgimento da PIN, ou simplesmente reflete um aumento da sensibilidade na detecção desta lesão.

Foram encontrados 2 adenocarcinomas, correspondendo a 4.54% dos casos, semelhante à prevalência relatada por Weaver (1981), de 3.5%. No entanto, a prevalência relatada por Bell et al. (1991) é menor (de 0.6 a 2%), e a relatada por Teske et al. (2002), maior (13%).

Nos dois casos, foi encontrado concomitantemente PIN, sugerindo uma associação desta lesão com a neoplasia prostática. De acordo com esses achados, Waters e Bostwick (1997) demonstraram que esta lesão está presente em 66% das próstatas de cães com CP. Em humanos, focos de PIN de alto grau estão presentes em 85% dos carcinomas, e a presença destas lesões em biópsias é considerada o fator de risco mais importante para o carcinoma prostático (MCNEAL; BOSTWICK, 1986; BRAWER et al., 1992).

Morfometria nuclear

A área nuclear média das lesões pré-neoplásicas foram maiores em relação às dos ácinos benignos.

A utilização da análise morfométrica tem sido discutida na literatura há mais de 30 anos, porém não é uma técnica amplamente utilizada, estando restrita a poucos centros de pesquisa ou diagnóstico. Isso se deve às limitadas evidências de que essa técnica possa prover algoritmos estáveis, específicos e reprodutíveis, que possam ser utilizadas na avaliação das neoplasias.

Por outro lado, é uma ferramenta de baixo custo, podendo ser realizada em coloração padrão de hematoxilina-eosina. Assim, acreditamos que possa ser utilizada como auxiliar na avaliação das lesões pré-neoplásicas.

Conexinas

Não foi observada marcação para as conexinas 32 e 43 em epitélio prostático canino. Em humanos, as conexinas 32 e 43 são encontradas nas células luminais e basais, respectivamente (HABERMANN et al., 2002), sendo que a expressão destas estão alteradas nas afecções benignas e malignas da próstata (HABERMANN et al., 2002; SALADINO et al., 2002).

Provavelmente outras conexinas devem estar presentes na próstata canina, sendo importante o seu estudo.

Receptor de andrógeno

Foi realizada imunoistoquímica para avaliar a presença e localização do receptor de andrógeno em próstata normal e em próstatas apresentando diferentes afecções.

Tanto as células epiteliais luminais quanto as estromais apresentaram marcação positiva para o AR; a intensidade de marcação variou entre os diferentes tipos de afecções.

A maioria das células basais acinares apresentava marcação positiva, moderada a intensa. Na próstata humana e canina, foi demonstrada a presença desse receptor nas células epiteliais luminais, estromais e basais, porém há controvérsias em relação à presença de AR neste último tipo celular (BONKHOF; REMBERGER, 1993; PRINS et al., 1996; EL-ALFY et al., 1999; LEAV et al., 2001).

Em próstatas normais e hiperplásicas observou-se marcação nuclear de intensidade moderada a intensa em células epiteliais luminais e estromais, de acordo com o observado em outros estudos com próstata canina (LEAV et al., 2001; GALLARDO et al., 2007). Estes dados estão de acordo com os resultados da PCR em tempo real, em que a expressão do RNAm do AR em próstatas normais e hiperplásicas foi em sua maioria maior em relação ao padrão (2 animais castrados).

A maioria das células basais apresentou marcação moderada a intensa com uma pequena porcentagem exibindo marcação ausente a discreta. De acordo com esses achados, Leave et al. (2001), estudando próstatas de cães jovens e cães sexualmente maduros, também relatou marcação para o AR em células basais ductais e acinares em próstatas de animais jovens e animais sexualmente maduros.

Foi observada também marcação nuclear de intensidade moderada nas células epiteliais luminais em meio à prostatite. No entanto, não foi observada marcação na próstata que apresentou prostatite difusa, com formação de folículos. Gallardo et al. (2007) também observou uma menor intensidade de marcação e uma menor porcentagem de células positivas para este receptor em ácinos prostáticos em meio a prostatite em relação a ácinos normais ou hiperplásicos, em próstata canina.

Já na PIN, o que chamou a atenção foi a heterogenidade em relação à expressão do AR, em que uma mesma lesão apresentava núcleos exibindo marcação discreta, moderada ou intensa, sendo em geral de menor intensidade em relação aos núcleos de ácinos normais ou hiperplásicos. Não há relatos na literatura em relação a este receptor na PIN canina. Já em humanos, as células de PIN apresentam marcação nuclear para o AR (HARPER et al., 1998; MONTIRONI; MAZZUCHELLI; SCARPELLI, 2002).

A menor expressão de AR nas PINs observadas neste estudo pode ser devido à origem a partir de células basais malignas presentes entre as células basais, visto que uma parte destas não apresenta marcação para este receptor. Estas células proliferariam, diferenciar-se-iam parcialmente ou totalmente, e uma parte delas poderia passar a expressar o AR.

Outra explicação para a heterogeneidade de marcação vista nas PINs seria a origem destas a partir de células luminais ou basais, malignas, que expressariam este receptor, e com as alterações celulares subsequentes à transformação neoplásica perderiam a expressão do AR, ou apresentariam menor estabilidade do AR.

Por outro lado, as enzimas 5 α -reductase I e II, responsáveis pela transformação da testosterona dihidrotestosterona, foram descritas em células luminais e principalmente em células basais em humanos (EICHELER et al., 1994; HABIB et al., 1998; PELLETIER et al., 1998), sugerindo que o andrógeno seja transportado das células basais para as luminais, onde exerceria sua ação. Sabe-se também que a testosterona e o DHT se ligam ao AR, promovendo sua associação a corretores e sua translocação para o núcleo celular (HEILEIN; CHANG, 2004). Na PIN, poderia haver uma diminuição da ligação destes hormônios ao AR, devido à perda da arquitetura exibida entre as células luminais e basais, não havendo então translocação do AR para o núcleo, explicando a menor expressão deste receptor nas PINs.

Apesar da menor expressão deste receptor nessas lesões na espécie canina, o papel hormonal na carcinogênese prostática não deve ser descartado, visto que cães castrados apresentam menor incidência de PIN (WATERS; BOSTWICK, 1997). Assim, a castração não diminuiria o risco de evolução para o câncer em animais que já apresentassem PINs de alto grau no momento da castração. Em humanos, porém, há uma diminuição na prevalência e extensão de PIN de alto grau após terapia por ablação de andrógenos (FERGUSON et al., 1994).

Já pelos resultados da PCR, não é possível afirmar que as próstatas que apresentam estas lesões expressam mais ou menos RNAm para o AR, já que em uma delas a expressão foi alta e em outras 2, baixa. Além disso, o PCR em tempo real de amostras teciduais coletadas aleatoriamente numa próstata não permite afirmar que a lesão estivesse presente na amostra. Neste caso, a microdissecção permitiria um melhor estudo destas lesões.

Em relação às neoplasias, foi observada, pela imunoistoquímica, marcação predominantemente nuclear moderada a intensa de AR na maioria das células neoplásicas. Os estudos descritos na literatura são controversos em relação à expressão de AR em carcinomas

prostáticos caninos. Leave et al., ao estudar 19 carcinomas prostáticos em cães, observou que apenas 1 deles expressava este receptor. Lai et al. (2008) encontrou marcação para o AR em 16 de 20 carcinomas prostáticos, porém de menor intensidade em relação às de próstatas normais.

Outro estudo comparando a expressão diferencial desse receptor em próstatas normais, hiperplásicas, inflamadas e neoplásicas mostrou que o receptor está presente em 65% das células neoplásicas (GALLARDO et al., 2007). A presença do receptor nos adenocarcinomas encontrados no presente estudo pode ser explicada por diferenças do tipo neoplásico, técnica utilizada (técnica mais sensível) ou por representarem carcinomas em estágio inicial.

Cães castrados apresentam incidência maior ou igual de câncer de próstata, sendo estes de comportamento mais agressivo (WATERS et al, 1997; WATERS; BOSTWICK, 1997). Uma das hipóteses é a de que a castração, em animais já apresentando PIN, selecionaria células andrógeno-independentes, mais indiferenciadas ou mais malignas. Desta maneira, os 2 carcinomas encontrados no presente estudo em animais inteiros apresentariam características menos malignas; o fato de que apresentam o AR suporta também esta hipótese.

Já em humanos, estudos imunoistoquímicos demonstraram que a expressão do AR é mantida durante a progressão do CP, e a maioria dos AIPC expressa AR, com algumas células focais apresentando uma menor expressão de AR (SADI; WALSH; BARRACK, 1991; CHODACK et al., 1992; HARPER et al., 1998). Não se sabe, no entanto, a causa dessa menor expressão focal. Células basais malignas com menor expressão de AR poderiam corresponder a estas células, desempenhando papel no desenvolvimento do carcinoma andrógeno-independente.

Finalmente, devemos considerar que apesar do AR canino ser similar ao AR humano, principalmente no domínio de ligação a andrógenos e domínio de ligação ao DNA, as proteínas não são idênticas (LU et al., 2001). Assim, deve haver diferenças importantes no perfil de genes modulados por este receptor, com consequências fisiológicas diversas, entre as duas espécies.

Células basais

Utilizamos como marcadores de células basais os anticorpos anti-34 β E12 e anti-p63. O anticorpo anti-34 β E12 é um anticorpo monoclonal, que reage com citoqueratinas de alto peso

molecular é um marcador de células basais bem conhecido, e que normalmente não está presente nos adenocarcinomas prostáticos em humanos (GOWN; VOGEL, 1984; BRAWER et al., 1985; HEDRICK; EPSTEIN, 1989; WOJNO; EPSTEIN, 1995). O anticorpo anti-p63 reage com a proteína nuclear p-63, mais recentemente descoberta (SIGNORETTI et al., 2000; WEINSTEIN et al., 2002).

Células basais, 34 β E12 positivas, foram observadas formando uma camada contínua ao redor de ductos, e formando uma camada descontínua ao redor de ácinos. Já células basais, positivas para a proteína nuclear p63, foram observadas formando uma camada descontínua ao redor de ductos e ácinos. Esse achado sugere que os ácinos apresentam células 34 β E12 e/ou p63 positivas e os ductos apresentam tanto células 34 β E12/p63 positivas quanto células 34 β E12 positivas/p63 negativas.

Nesse contexto, Leave et al. (2001), estudando próstatas caninas, observou que, após a castração, células 34 β E12 positivas eram mantidas apenas nas células basais ductais, desaparecendo nas células basais acinares, sugerindo que existam duas populações diferentes de células basais: as ductais e as acinares. Essas células basais que permanecem após a castração podem estar envolvidas no desenvolvimento do carcinoma prostático observado nesses animais.

Esse mesmo autor também descreve que as células basais estão presentes continuamente ao redor de ductos e de forma esporádica ao redor de ácinos, utilizando imunoistoquímica para 34 β E12. Ele observou também que, com a idade, o número de células basais aumenta, estando desta maneira relacionadas ao processo de hiperplasia glandular encontrada em animais de 4 a 8 anos. Observou, ainda, que em animais acima de 9 anos apresentando HPB complexa, essas células estão ausentes nos ácinos. Ele sugere que a proliferação estromal que ocorre na forma complexa da HPB, levando à obstrução de ductos e conseqüente formação de estruturas císticas, cause um efeito negativo na diferenciação e proliferação de células basais.

Em contraste a esse estudo, observamos que ácinos dilatados presentes na forma complexa da HPB apresentam células colunares p63 e 34 β E12 negativas e células pavimentosas p63 e 34 β E12 positivas. Essas diferenças podem ser devidas às técnicas imunoistoquímicas empregadas; no presente estudo utilizamos o tampão EDTA no desmascaramento antigênico, que se mostrou melhor em relação ao tampão citrato, utilizado neste outro estudo.

Nesse estudo observamos que as PINs exibiam uma maior porcentagem de células p63 positivas em relação aos ácinos normais ou hiperplásicos. Essas células também apresentavam

marcação para o 34 β E12, de maneira semelhante ao p63. Por outro lado, um outro estudo demonstra que a camada basal está rompida em ácinos com PIN (WATERS et al., 1997), porém como a camada de células basais é normalmente descontínua em ácinos normais, acreditamos que a interrupção da camada de células basais, critério utilizado em medicina humana para classificação em HGPIN ou carcinoma *in situ*, não pode ser aplicado com a mesma liberdade em próstatas caninas.

Leave et al. (2001) observou que as PINs estavam presentes em estruturas totalmente ou parcialmente circunscritas por células basais (34 β E12 positivas), sugerindo que essas lesões originam-se a partir de ductos prostáticos. No presente estudo, observamos PINs tanto em estruturas parcialmente circunscritas por células basais quanto em estruturas acinares, positivas para 34 β E12 ou p63 na região proliferativa e negativas para esses mesmos anticorpos no restante do ácino. Acreditamos, assim, que essas lesões possam surgir tanto a partir de ácinos quanto a partir de ductos. De fato, a definição de neoplasia intraepitelial prostática compreende alterações proliferativas em ductos e ácinos pré-existent.

As células basais têm sido descritas como células indiferenciadas precursoras de células lumbais secretórias e, em geral, acredita-se que as *stem cells* estejam localizadas neste compartimento (BURGER et al., 2005; XIN; LAWSON; WITTE, 2005).

Células basais malignas, ou possivelmente *stem cells* malignas, que não expressam AR, como descritas anteriormente, presentes entre as células basais, poderiam originar as PINs. Outra hipótese seria a de que estas lesões surgem a partir de células basais ou lumbais malignas que expressariam AR e posteriormente perderiam ou apresentariam menor estabilidade deste receptor.

A existência de uma subpopulação de *stem cells* andrógeno-independentes nos estágios iniciais do desenvolvimento do câncer de próstata pode ser responsável pelo insucesso da terapia anti-androgênica que ocorre na maioria dos cânceres em estágios avançados, devido à evolução para o adenocarcinoma andrógeno-independente (ISAACS, 1999; FELDMAN; FELDMAN, 2001).

Grieco et al. (2003) demonstrou em próstatas caninas que as células tumorais expressam tanto citoqueratinas para células basais quanto para células lumbais, sugerindo uma origem a partir de *stem cells*. Também em humanos, subpopulações de células tumorais expressando marcadores de células basais e lumbais também foram relatados (JONES; HARPER, 1992;

VERHAGEN et al., 1992; PEEHL et al., 1994; BONKHOF; REMBERGER, 1996; WANG et al., 2001).

Corroborando essa idéia, observamos uma maior porcentagem de núcleos positivos para p63 nas 2 neoplasias encontradas neste estudo; estas apresentavam também ampla marcação para o 34βE12.

Proliferação celular

Sabe-se que distúrbios de proliferação e apoptose são eventos importantes nos estágios iniciais da carcinogênese, podendo ser úteis na caracterização de tecidos histologicamente normais, porém sob maior risco de sofrer transformação neoplásica. O índice proliferativo de células tumorais é sugerido como um parâmetro prognóstico adicional (MIYAMOTO et al., 2006).

Em humanos e em cães, são reconhecidas morfologicamente 2 tipos de células acinares: células luminais e basais. Imunofenotipicamente, além das células luminais e basais, são reconhecidas as células TP (transiently proliferating), que apresentam um padrão de expressão de citoqueratinas intermediário entre células luminais e basais (VERHAGEN et al., 1992; 1998; MAHAPOKAI et al, 2000;).

Células com morfologia basal apresentaram marcação positiva para PCNA. Segundo a teoria descrita acima, essas poderiam corresponder a células basais ou células TP. Leave et al. (2001), estudando próstata canina, observou que a maioria das células em proliferação, utilizando imunoistoquímica em cortes seriados para o Ki-67 e para o 34βE12, eram células basais. Encontrou, entretanto, células ki-67 positivas/34βE12 negativas, sugerindo que essas correspondam a células TP.

Tanto ácinos normais quanto hiperplásicos apresentaram poucas células PCNA positivas, refletindo os baixos índices proliferativos.

Em áreas de PIN, foi observada maior porcentagem de núcleos PCNA positivos em relação aos ácinos benignos, confirmando a maior atividade proliferativa nestas áreas. Os 2 adenocarcinomas exibiram também altos índices proliferativos, de 17.37 e 8.59%. Waters e

Bostwick (1997) também demonstraram maior porcentagem de células em proliferação em PIN canino em relação ao epitélio normal, porém menor do que em carcinoma de próstata, por imunohistoquímica para MIB-1. Já Waters et al. (1997), utilizando imunohistoquímica para MIB-1, encontrou índices proliferativos de 17% em epitélio benigno e de 25% em PIN canino. Em humanos, Helpap (1995), utilizando também o PCNA, mostrou que o índice proliferativo é maior em PIN em relação ao epitélio benigno.

Observou-se também marcação para PCNA em vários ácinos dilatados, e também em alguns ácinos normais, próximos aos PINs, sendo estes ácinos provavelmente mais propensos ao desenvolvimento de PIN. *Field effect*, que se refere a células geneticamente alteradas, porém fenotipicamente normais, próximas a focos de câncer, tem sido estudada em humanos na cavidade oral e em pulmões (SLAUGHTER; SOUTHWICK; SMEJKAL, 1953; BRAAKHUIS et al., 2003). Nesse contexto, uma maior expressão de Mcm-2, um marcador de proliferação, foi demonstrada, por imunohistoquímica, em glândulas normais próximas a focos de câncer em relação a glândulas mais distantes em humanos (ANANTHANARAYANAN et al., 2006).

Considerações finais

Vimos que o cão, assim como o homem, desenvolve com a idade HPB, PIN e carcinoma prostático. Entretanto, a incidência do carcinoma prostático é menor em cães em relação aos homens. Uma das hipóteses dessa menor incidência seria a menor detecção dessa neoplasia em cães, visto que não há, nessa espécie, screenings como dosagem de PSA, por exemplo. Outra hipótese é a de que os andrógenos seriam necessários para a evolução das lesões pré-neoplásicas; assim, essas não evoluiriam, visto que expressaram, em geral, menos AR.

Em humanos as PINs são constituídas por células luminais. Nesse estudo vimos que essas lesões apresentam uma maior porcentagem de células basais, apresentando assim, uma menor taxa de células luminais para basais. Talvez a diferenciação em células luminais, expressando AR, seria necessária para a evolução das PINs.

Por outro lado, células andrógeno-independentes são consideradas mais agressivas, logo essas lesões pré-neoplásicas que apresentaram menor expressão de AR seriam mais agressivas também, o que não explicaria a menor incidência de carcinomas prostáticos nessa espécie.

Em humanos, sabe-se que as lesões pré-neoplásicas regredem com a ablação androgênica, porém não se sabe se isso ocorre em cães. Esse estudo em cães seria interessante a fim de se determinar se há regressão das PINs após ablação androgênica, apesar da menor expressão deste receptor nessas lesões.

Não se pode esperar que um modelo único, seja animal, *in vitro* ou utilizando tecidos humanos, possa fornecer informações a cerca de toda a diversidade e heterogeneidade das afecções prostáticas em termos de genética, morfologia, resposta a hormônios ou comportamento biológico. Além disso, modelos não devem servir apenas para comparar similaridades, mas diferenças também. Assim, mais importante que definir qual o melhor modelo para o estudo dessas afecções, é importante estudar as particularidades de cada modelo e sua contribuição no entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessas.

Assim, acreditamos que as lesões pré-neoplásicas em cães contribuem para a elucidação do processo de carcinogênese prostática, pois são compostas parcialmente por uma população de células andrógeno-independentes, sendo importante futuramente compreender os mecanismos por meio dos quais estas evoluem para o carcinoma.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- As alterações mais freqüentes encontradas foram a prostatite, seguida da hiperplasia prostática benigna.
- As PINs podem se originar a partir de células basais malignas AR negativas presentes entre as células basais ou a partir de células luminais ou basais, malignas, que expressariam AR, e com as alterações celulares subseqüentes à transformação neoplásica perderiam a expressão do AR, ou apresentariam menor estabilidade do AR.
- As células das PINs apresentam características neoplásicas, como maior índice proliferativo e pleomorfismo nuclear.
- Mais estudos são necessários para se definir se as PINs são precursoras do carcinoma prostático em cães, visto que, diferentemente de humanos, apresentam menor expressão de AR.
- O receptor de andrógeno está presente na maioria das células basais de ácinos normais da próstata canina, a despeito das controvérsias a respeito da presença deste nas células basais.
- A próstata canina não expressa as conexinas 32 e 43.
- As PINs e as neoplasias apresentaram maior marcação para p63, demonstrando a importância das células basais na carcinogênese prostática. O critério utilizado em medicina humana para classificação em HGPIN ou carcinoma *in situ* (camada de células basais descontínua), não pode ser aplicado com a mesma liberdade em próstatas caninas.
- A área nuclear média foi significativamente maior em ácinos apresentando PIN e/ou neoplasia em relação aos ácinos normais ou hiperplásicos.

REFERÊNCIAS*

AKHAVAN, A.; KEITH, J. D.; BASTACKY, S. I.; CAI, C.; WANG, Y.; NELSON, J. B. The proportion of cores with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia on extended-pattern needle biopsy is significantly associated with prostate cancer on site-directed repeat biopsy. **BJU International**, v. 99, p. 765–769, 2007.

ALBERTSEN, P. C.; HANLEY, J. A.; FINE, J. 20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer. **The Journal of the American Medical Association**, v. 293, n. 17, p. 2095-2101, 2005.

AMIN, M. B.; RO, J. Y.; AYALA, A. G. Putative precursor lesions of prostatic adenocarcinoma: fact or fiction? **Modern Pathology**, v. 6, p. 476-483, 1993.

AMORIM, R. L. **Estudo clínico, laboratorial e anatomopatológico das próstatas de cães adultos**. 2001. 117 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2001.

ANANTHANARAYANAN, V.; DEATON, R. J.; YANG, X. J.; PINS, M. R.; GANN, P. H. Alteration of proliferation and apoptotic markers in normal and premalignant tissue associated with prostate cancer. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/6/73>. Acesso em 13/01/2009.

AQUILINA, J. W.; MCKINNEY, L.; PACELLI, A.; RICHMAN, L. K.; WATERS, D. J.; THOMPSON, I.; BURGHARDT JR, W.F.; BOSTWICK, D. G. High grade prostatic intraepithelial neoplasia in military working dogs with and without prostate cancer. **Prostate**, v. 36, p. 189-93, 1998.

BAAK, J. P. The principles and advances of quantitative pathology. **Analitical and Quantitative Cytology Histology**, v.9, p. 89 -95, 1987.

BARSANTI, J. A.; FINCO, D. R. Canine prostatic diseases. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 16, n.3, p. 587-599, 1986.

* De acordo com: NBR 6023

- BARSANTI, J. A.; FINCO, D. R. Medical management of canine prostate hyperplasia. In: KIRK, R. W. (Ed.). **Current veterinary therapy XII**. Philadelphia: WB Saunders, 1995. p.1033-1034.
- BELL, F. W.; KLAUSNER, J. S.; HAYDEN, D. W.; FEENEY, D. A.; JOHNSTON, S. D. Clinical and pathologic features of prostatic adenocarcinoma in sexually intact and castrated dogs: 31 cases (1970-1987). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 199, n.11, p. 1623-1630, 1991.
- BERNARDS, R.; WEINBERG, R. A. A progression puzzle. **Nature**, v. 418, n. 6900 p. 823-824, 2002.
- BERRY, S. J.; STRANDBERG, J. D.; SAUNDERS, W. J.; COFFEY, D. S. Development of canine benign prostatic hyperplasia with age. **Prostate**, v. 9, n. 4, p. 363-373, 1986.
- BILLIS, A.; POMPEO, A. C.L. Adenocarcinoma de próstata. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 29, n.1, p. 27-34, 2003. Supplement, 1.
- BLACK, G. M.; LING, G. V.; NYLAND, T. G.; BAKER, T. Prevalence of prostatic cysts in adult, large-breed dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 34, n.2, p. 177-180, 1998.
- BONKHOF, H.; REMBERGER, K. Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: A stem cell model. **Prostate**, v. 28, n.2, p. 98-106, 1996.
- BONKHOF, H.; REMBERGER, K. Widespread distribution of nuclear androgen receptors in the basal cell layer of the normal and hyperplastic human prostate. **Virchows Arch. A, Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 422, n.1, p. 35-38, 1993.
- BORING, C. C.; SQUIRES, T. S.; TONG, T.; MONTGOMERY, S. Cancer statistics. 1994. **CA Cancer J Clin**, v. 44, n.1, p. 7-26, 1994.
- BOSTWICK, D. G.; BRAWER, M. K. Prostatic intraepithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. **Cancer**, v. 59, p. 788-794, 1987.
- BOSTWICK, D. G.; PACELLI, A.; LOPEZ-BELTRAN, A. Molecular biology of prostate intraepithelial neoplasia. **Prostate**, v. 29, n. 2, p. 117-134, 1996.

BOSTWICK, D. G.; QIAN, J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Modern Pathology**, v. 17, n. 3, p. 360–379, 2004.

BRAAKHUIS, B. J.; TABOR, M. P.; KUMMER, J. A.; LEEMANS, C. R.; BRAKENHOFF, R. H. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. **Cancer Research**, v. 63, n. 8, p. 1727-1730, 2003.

BRAVO, R.; FRANK, R.; BLUNDELL, P. A. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase. **Nature**, v. 326, n.6112, p. 515-517, 1987.

BRAWER, M. K. Prostatic intraepithelial neoplasia: a premalignant lesion. **Journal of Cellular Biochemistry**, p. 171-174, 1992. Supplement, 16G.

BRAWER, M. K.; PEEHL, D. M.; STAMEY, T. A.; BOSTWICK, D. G. Keratin immunoreactivity in the benign and neoplastic human prostate. **Cancer Research**, v. 45, n.8, p. 3663-3667, 1985.

BRAWLEY, O.W.; KNOFF, K.; THOMPSON, I. The epidemiology of prostate cancer part II: the risk factors. **Seminars in Urologic Oncology**, v. 16, n. 4, p. 193–201, 1998.

BRINKMANN, A. O.; BLOK, L. J. ; RUITER, P. E.; DOESBURG, P.; STEKETEE, K.; BERREVOETS, C. A.; TRAPMAN, J. Mechanisms of androgen receptor activation and function. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 69, n.1-6, p. 307-313, 1999.

BRYAN, J. N.; KEELER, M. R.; HENRY, C. J.; BRYAN, M. E.; HAHN, A. W.; CADWELL, C. W. A population study of neutering status as a risk factor for canine prostate cancer. **The prostate**, v. 67, n. 11, p. 1174-1181, 2007.

BURGER, P.; XIONG, X.; COETZEE S.; SALM, S. M.; MOSCATELLI, D.; GOTO, K.; WILSON, E. L. Sca-1 expression identifies stem cells in the proximal region of prostatic ducts with high capacity to reconstitute prostatic tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n.20, p. 7180–7185, 2005.

CARTER, H.B. The prostate: an increasing medical problem. **Prostate**, v. 16, n.1, p. 39–48, 1990.

CHAPDELAINE, P.; DUBÉ, J. Y.; FRENETTE, G.; TREMBLAY, R. R. Identification of arginine esterase as the major androgen-dependent protein secreted by the dog prostate and preliminary molecular characterization in seminal plasma. **Journal of Andrology**, v. 5, n.3, p. 206-210, 1984.

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. **The Journal of Urology**, v. 147, p. 798-803, 1992.

CLEMENS, J. Q.; MEENAN, R. T.; O'KEEFFE ROSETTI, M. C.; GAO, S.Y.; CALHOUN, E. A. Incidence and clinical characteristics of National Institutes of Health type III prostatitis in the community. **The Journal of Urology**, v. 174, n. 6, p. 2319-2322, 2005.

COFFEY, D. S.; WALSH, P. C. Clinical experimental studies of benign prostatic hyperplasia. **The Urologic Clinics of North America**, v. 17, n.3, p. 461-75, 1990.

COLLAN, Y.; TORKKELI, T.; PESONEN, E.; JANTUNEN, E.; KOSMA, V. M. Application of morphometry in tumor pathology. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 9, n. 2, p. 79-88, 1987.

COLLINS, A.; BERRY, P.; HYDE, C.; STOWER, M. J.; MAITLAND, N. J. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. **Cancer Research**, v. 65, n.23, p. 10946–10951, 2005.

COLLINS, A.; HABIB, F.; MAITLAND, N.; NEAL, D. E. Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on $\alpha 2\beta 1$ -integrin expression. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 3865–3872, 2001.

COLOMBEL, M.; SYMMANS, F.; GIL, S.; O'TOOLE, K. M.; CHOPIN, D.; BENSON, M.; OLSSON, C. A.; KORSMEYER, S.; BUTTYAN, R. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers. **The American Journal of Pathology**, v. 143, n.2, p. 390-400, 1993.

COONEY, J. C.; CARTEE, R. E.; GYAY, B. W.; RUMPH, P. F. Ultrasonography of the canine prostate with histologic correlation. **Theriogenology**, v. 38, n. 5, p. 877-895, 1992.

CORNELL, K. K.; BOSTWICK, D. G.; COOLEY, D. M.; HALL, G.; HARVEY, H. J.; HENDRICK, M. J.; PAULI, B. U.; RENDER, J. A.; STOICA, G.; SWEET, D. C.; WATERS, D. J. Clinical and pathologic aspects of spontaneous canine prostate carcinoma: a retrospective analysis of 76 cases. **The Prostate**, v. 45, n.2, p. 173-183, 2000.

CORNELL, K. K.; WATERS, D. J.; COOLEY, D. M.; PAULI, B.; HARVEY, H. J.; HALL, G.; RENDER, J.; HENDRICK, M.; SWEET, D.; STOICA, G. Canine prostate carcinoma; clinicopathologic findings in 168 cases. In: **Proceedings Ann. Meeting Am. Coll. Vet. Radiol.**, 1997, p. 86.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. The male genital tract. In: ROBBINS, S. L. **Pathological basis of disease**. 6 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999. p. 1011-1034.

DE ANDREA, C. E.; BLEGGI-TORRES, L. F.; ALVES, M. T. S. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 1, p. 51-57, 2008.

DE MARZO, A. M.; COFFEY, D. S.; NELSON, W. G. New concepts in tissue specificity for prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **Urology**, v. 53, p. 29-40, 1999. Supplement, 3a.

DE WINTER, J. A. R.; JANSSEN, P. J. A.; SLEDDENS, H. M. E. B.; VERLEUN-MOOIJMAN, M. C. T.; TRAPMAN, J.; BRINKMANN, A. O.; SANTERSE, A. B.; SCHROEDER, F. H.; VAN DER KWAST, T. H. Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 144, n. 4, p. 735-746, 1994.

DIAMOND, D. A.; BERRY, S. J.; JEWETT, H. J.; EGGLESTON, J. C.; COFFEY, D. S. New method to assess metastatic potential of human prostate cancer: relative nuclear roundness. **The Journal of Urology**, v. 128, n. 4, p. 729-734, 1982.

DI SANTIS, G. W. **Estudo morfológico, morfométrico e imunoistoquímico de próstatas caninas normais e hiperplásicas**. 2003. 128p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

EDWARDS, A.; HAMMOND, H. A.; JIN, L.; CASKEY, C. T.; CHAKRABORTY, R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. **Genomics**, v. 12, n.2, p. 241-253, 1992.

EICHELER, W.; TUOHIMAA, P.; VILJA, P.; ADERMANN, K.; FORSSMANN, W. G.; AUMULLER, G. Immunocytochemical localization of human 5 α -reductase 2 with polyclonal antibodies in androgen target and nontarget tissue. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 42, n. 5, p. 667-675, 1994.

EL-ALFY, M.; LUU-THE, V.; HUANG, X. F.; BERGER, L.; LABRIE, F.; PELLETIER, G. Localization of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry. **Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 1481-1491, 1999.

ENGLAND, G C.; ALLEN, W. E.; MIDDLETON, D. J. An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. **Research in Veterinar Science**, v.49, n.1, p.66-70, 1990.

EPSTEIN, J. I. Pathologic assessment of the surgical specimen. **The Urologic Clinics of North America**, v. 28, n. 3, p. 567–594, 2001.

EPSTEIN, J. I. Precursor lesions to prostatic adenocarcinoma. **Virchows Archiv**, v. 451, n.1, p. 1-16, 2009.

EPSTEIN, J. I.; HERAWI, M. Prostate needle biopsies containing prostatic intraepithelial neoplasia or atypical foci suspicious for carcinoma: implications for patient care. **The Journal of Urology**, v. 175, p. 820–834, 2006.

EVANS, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, v. 240, n. 4854, p. 889–895, 1988.

EVANS, H. E.; CHRISTENSEN, G. C. The urogenital system. In:_____. **Miller's anatomy of the dog**. Philadelphia: WB Saunders, 1993. p.514-516.

FANG, S.; ANDERSON, K.M, LIAO, S. Receptor proteins for androgens. On the role of specific proteins in selective retention of 17- β -hydroxy-5- α -androstan-3-one by rat ventral prostate in vivo and in vitro. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 24, p. 6584–6595, 1969.

FELDMAN, B. J.; FELDMAN, D. The development of androgen-independent prostate cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v.1, n.1, p.23-45, 2001.

- FENTON, M. A.; SHUSTER, T. D.; FERTIG, A. M.; TAPLIN, M. E.; KOLVENBAG, G.; BUBLEY, G. J.; BALK, S. P. Functional characterization of mutant androgen receptors from androgen-independent prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 3, n.8, p.1383–1388, 1997.
- FERGUSON, J.; ZINCKE, H.; ELLISON, E.; BERQSTRAHL, E.; BOSTWICK, D. G. Decrease of prostatic intraepithelial neoplasia following androgen deprivation therapy in patients with stage T3 carcinoma treated by radical prostatectomy. **Urology**, v. 44, n. 1, p. 91-95, 1994.
- FISHMAN, G.I.; EDDY, R.L.; SHOWS, T.B.; ROSENTHAL, L.; LEINWAND, L.A. The human connexin gene family of gap junction proteins: distinct chromosomal locations but similar structures. **Genomics**, v. 10, n. 1, p. 250-256, 1991.
- GADDIPATI, J. P.; MCLEOD, D. G.; HEIDENBERG, H. B.; SESTERHENN, I. A.; FINGER, M. J.; MOUL, J. W.; SRIVASTAVA, S. Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers. **Cancer Research**, v. 54, n.11, p. 2861–2864, 1994.
- GALLARDO, F.; MOGAS, T.; BARO, T.; RABANAL, R.; MOROTE, J.; ABAL, M.; REVENTÓS, J.; LLORETA, J. Expression of androgen, oestrogen α and β , and progesterone receptors in the canine prostate: differences between normal, inflamed, hyperplastic and neoplastic glands. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, n. 1, p. 1-8, 2007.
- GAO, T.; MARCELLI, M.; MCPHAUL, M. J. Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 59, n.1, p. 9-20, 1996.
- GLEASON, D. L. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In: TANNENBAUM, M. (Ed.). **Urologic pathology: the prostate**. Lea & Febiger: Philadelphia, 1977. p. 171-197.
- GLEASON, D. L. Histologic grading of prostatic carcinoma. In: BOSTWICK, D. G. (Ed.). **Pathology of the prostate**. New York: Churchill Livingstone, 1990. p. 83–93.
- GLOYNA, R. E.; SIITERI, P. K.; WILSON, J. D. Dihydrotestosterone in prostatic hypertrophy. II. The formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrophic canine prostate and the effect of dihydrotestosterone on prostate growth in the dog. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 49, p. 1746–1753, 1970.

GOODENOUGH, D.A. In: KORN, E. D (Ed.). **Methods in membrane biology**. New York: Plenum, 1975. p.51-80.

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. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 50087-50097, 2002.

GOWN, A. M.; VOGEL, A. M. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins: distribution of filament proteins in normal human tissues. **The American Journal of Pathology**, v. 114, n.2, p. 309-321, 1984.

GRIECO, V.; PATTON, V.; ROMUSSI, S.; FINAZZI, M. Cytokeratin and vimentin expression in normal and neoplastic canine prostate. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, n.1, p. 78-84, 2003.

GRIFFITHS, K.; EATON, C. L.; HARPER, M. E.; PEELING, B.; DAVIES, P. Steroid hormones and the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. **European Urology**, v. 20, p. 68-77, 1991. Supplement, 1.

GRISANZIO, C.; SIGNORETTI, S. p63 in prostate biology and pathology. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 103, n. 5, p. 1354-1368, 2008.

GUINAN, P. D.; SADOUGHI, W.; ALSHEIK, H.; ABLIN, R. J.; ALRENGA, D.; BUSH, I. M. Impotence therapy and cancer of the prostate. **American Journal of Surgery**, v. 131, n.5, p. 599-600, 1976.

HABIB, F. K.; ROSS, M.; BAYNE, C. W.; GRIGOR, K.; BUCK, A. C.; BOLLINA, P.; CHAPMAN, K. The localisation and expression of 5 alpha-reductase types I and II mRNAs in human hyperplastic prostate and in prostate primary cultures. **The Journal of Endocrinology**, v. 56, n. 3, 1998.

HABERMANN, H.; RAY, V.; HABERMANN, W.; PRINS, G. S. Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **The Journal of Urology**, v. 167, p. 655-660, 2002.

HARPER, M. E.; GLYNNE-JONES, E.; GODDARD, L.; MATHEWS, P.; NICHOLSON, R. I. Expression of androgen receptor and growth factors in premalignant lesions of the prostate. **Journal of Pathology**, v. 186, n.2, p. 169-177, 1998.

HEDRICK, L.; EPSTEIN, J. I. Use of keratin 903 as an adjunct in the diagnosis of prostate carcinoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 13, n.5, p. 389-396, 1989.

HEILEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen receptor in prostate cancer. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 2, p. 276-308, 2004.

HELPAP, B. Cell kinetic studies on intraepithelial neoplasia (PIN) and atypical adenomatous hyperplasia (AAH) of prostate. **Pathology, Research and Practice**, v. 191, n.9, p. 904-907, 1995.

HORNBuckle, W. E.; MACCOY, D. M.; ALLAN, G. A.; GUNTHER, R. Prostatic disease in the dog. **The Cornell Veterinarian**, v. 68, p. 284-305, 1978. Supplement, 7.

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. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 26, n.1, p. 1-10, 2001

ISAACS, J. Control of cell proliferation and cell death in the normal and neoplastic prostate: A stem cell model. In: RODGERS, C.; COFFEY, D.; CUNHA, G.; GRAYHACK, J. T.; HINMAN, F.; HORTON, R. (Eds.). **Benign prostatic hyperplasia**. NIH: Bethesda, MD, 1987. Vol II, p. 85-94.

ISAACS, J. T. The biology of hormone refractory prostate cancer: Why does it develop? **The Urologic Clinics of North America**, v. 26, n.2, p. 263-273, 1999.

ISAACS, W. B.; SHAPER, J. H. Isolation and characterization of the major androgen-dependent glycoprotein of canine prostatic fluid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n.10, p. 6610-6615, 1983.

JACKSON, J.A.; WAXMAN, J.; SPIEKERMAN, A. M. Prostatic complications of testosterone replacement therapy. **Archives of Internal Medicine**, v. 149, n.10, p.2365-2366, 1989.

JOHNSON, M. I.; ROBINSON, M. C.; MARSH, C.; ROBSON, C. N.; NEAL, D.E.; HAMDY, F. C. Expression of bcl-2, bax and p-53 in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and localized prostate cancer: relationship with apoptosis and proliferation. **Prostate**, v. 37, n.4, p. 223-229, 1998.

JOHNSTON; S. D.; KAMOLPATANA, K.; ROOT-KUSTRITZ, M. V.; JONHSTON, G. R. Prostatic disorders in the dog. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 405-415, 2000.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. R.; OLSON, P. M. S. Sexual differentiation and normal anatomy of the dog. In _____. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: WB Saunders, 2001. 592p.

JONES, E. G.; HARPER, M. E. Studies on the proliferation, secretory activities, and epidermal growth factor receptor expression in benign prostatic hyperplasia explant cultures. **Prostate**, v. 20, n.2, p. 133-149, 1992.

JONIAU, S.; GOEMAN, L.; PENNING, J.; VAN POPPEL, H. Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): importance and clinical management. **European Urology**, v. 48, n. 3, p. 379-385, 2005.

KAMOLPATANA, K. **Effect of finasteride on benign prostatic hypertrophy in dogs**. 1998. 151p. Thesis - Graduate School, Washington State University, Pullman, p. 151.1998.

KENNEDY, P. C.; CULLEN, J.M; EDWARDS, J. F; GOLDSCHMIDT, M. H.; LARSEN, S.; MUNSON, L.; NIELSEN, S. Histological Classification of tumors of the genital system of domestic animals. In: SCHULMAN, F, Y. (Ed.). **WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL HISTOLOGICAL CLASSIFICATION OF TUMORS OF DOMESTIC ANIMALS**. Armed Forces Institute of Pathology. Washington. v.4. p.12-23. 1998.

KRAWIEC, D. R. Canine prostate disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 204, n. 10, p. 1561-1564, 1994.

KRAWIEC, D. R.; HEFLIN, D. Study of prostatic disease in dogs: 177 cases (1981-1986). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 8, p. 1119-1122, 1992.

KRISHNAN, V.; WANG, X.; SAFE, S. Estrogen receptor Sp1 complexes mediate estrogen-induced cathepsin D gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n.22, p. 15912-7, 1994.

KURITA, T.; MEDINA, R.; MILLS, A.; CUNHA, G. R. Role of p63 and basal cells in the prostate. **Development**, v. 131, n.20, p. 4955–4964, 2004.

KURIYAMA, M.; WANG, M. C.; LEE, C. L.; KILLIAN, C. S.; PAPSIDERO, L. D.; INAJI, H.; LOOR, R. M.; LIN, M. F.; NISHIURA, T.; SLACK, L. H.; MURPHY, G. P.; CHU, T. M. Multiple marker evaluation in human prostate cancer with the use of tissue specific antigens. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 68, n. 1, p. 99-205, 1982.

KUTZLER, M.; YEAGER, A. Prostatic diseases. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds.). **Textbook of veterinary internal medicine**. 6 ed. St Louis: WB Saunders, 2005. p. 1809–1819.

KYPRIANOU, N.; ISAACS, J. T. Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. **Endocrinology**, v. 122, n.2, p. 552-562, 1988.

LABRIE, F.; DUPONT, A.; BALANGER, A.; ST-ARNAUD, R.; GUIGUERRE, M.; LACOURCIERE, Y.; EMOND, J.; MONFETTE, G. Treatment of prostate cancer with gonadotropin-releasing hormone agonists. **Endocrine Reviews**, v. 7, n. 1, p 67-74, 1986.

LAM, J. S.; REITER, R. E. Stem cells in prostate and prostate cancer development. **Urologic Oncology: Seminars and Original investigations**, v. 24, n.2, p. 131-140, 2006.

LAROQUE, P. A.; PRAHALADA, S.; MOLON-NOBLOT, S.; COHEN, S. M.; SOPER, K.; DUPRAT, P.; PETER, C. P.; VAN ZWIETEN, M. J. Quantitative evaluation of glandular and stromal compartments in hyperplastic dog prostates: effect of 5-alpha reductase inhibitors. **The Prostate**, v. 27, n. 3, p. 121-128, 1995.

LAWSON, D.; XON, L.; LUKACS, R.; CHENG, D.; WITTE, O. N. Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 104, n.1, p.181–186, 2007.

LEAV, I.; LAU, K. M.; ADAMS, J. Y.; MCNEAL, J. E.; TAPLIN, M. E.; WANG, J.; SINGH, H.; HO, S. M. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 1, p. 79-92, 2001.

LEAV, I.; LING, G. V. Adenocarcinoma of the canine prostate. **Cancer**, v. 22, n. 6, p. 1329-1345, 1968.

LEAV, I.; SCHELLING, K. H.; ADAMS, J. Y.; MERK, F. B.; ALROY, J. Role of canine basal cells in prostatic post natal development, induction of hyperplasia, sex hormone-stimulated growth, and the ductal origin of carcinoma. **The Prostate**, v. 47, n.3, p. 149-163, 2001.

LIANG, T.; CASCIERI, M. A.; CHEUNG, A. H.; REYNOLDS, G. F.; RASMUSSEN, G. H. Species differences in prostatic steroid 5 α -reductases of rat, dog, and human. **Endocrinology**, v. 117, n. 2, p. 571–579, 1985.

LIU, A. Y.; NELSON, P. S.; VAN DER ENGH, G.; HOOD, L. Human prostate epithelial cell-type cDNA libraries and prostate expression patterns. **Prostate**, v. 50, n. 2, p. 92-103, 2002.

LOGAN, M. J. The pathology of the prostate gland of man and the dog: a review. **Cornell Veterinarian**, v. 37, p. 241-53, 1947.

LOWSETH, L. A.; GERLACH, R. F.; GILLET, N. A.; MUGGENBURG, B. A. Age-related changes in the prostate and testes of the beagle dog. **Veterinary Pathology**, v. 27, n. 5, p. 347-353, 1990.

LU, B.; SMOCK, S. L.; CASTLEBERRY, T. A.; OWEN, T. A. Molecular cloning and functional characterization of the canine androgen receptor. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 226, n. 1-2, p. 129-140, 2001.

MADWELL, B. R.; GANDOUR-EDWARDS, R.; DEVERE WHITE, R. W. Canine prostatic intraepithelial neoplasia: is the comparative model relevant? **Prostate**, v.58, n. 3, p. 314-317, 2004.

MAHAPOKAI, W.; XUE, Y.; VAN GARDEREN, E.; VAN SLUIJS, F. J.; MOL, J. A.; SCHALKEN, J. A. Cell kinetics and differentiation after hormonal-induced prostatic hyperplasia in the dog. **The prostate**, v. 44, n. 1, p. 40-48, 2000.

MCNEAL, J. E. Origin and development of carcinoma in the prostate. **Cancer**, v. 23, n. 1, p. 24–34, 1969.

MCNEAL, J. E. Relationship of the origin of benign prostatic hypertrophy to prostatic structure of man and other mammals. In: Hinman, F. (Ed.). **Benign prostatic hyperplasia**. New York: Springer-Verlag, 1983. p. 152-166.

MCNEAL, J. E.; BOSTWICK, D. G. Intraductal dysplasia: a premalignant lesion of the prostate. **Human Pathology**, v. 17, p. 64-71, 1986.

MIKI, J.; FURUSATO, B.; LI, H.; GU, Y.; TAKAHASHI, H.; EGAWA, S.; SESTERHENN, I. A.; MCLEOD, D. G.; SRIVASTANA, S.; RHIM, J. S. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTert-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. **Cancer Research**, v. 67, n. 7, p. 3153–3161, 2007.

MIYAMOTO, S.; ITO, K.; KUROKAWA, K.; SUZUKI, K.; YAMANAKA, H. Clinical validity of proliferating cell nuclear antigen as an objective marker for evaluating biologic features in patients with untreated prostate cancer. **International Journal of Urology**, v. 13, n. 6, p. 767-772, 2006.

MONTIRONI, R.; GALLUZI, C. M.; DIAMANTI, L.; GIANNULIS, I.; PISANI, E.; SCARPELLI, E. Prostatic intra-epithelial neoplasia: expression and location of proliferating cell nuclear antigen in epithelial, endothelial and stromal nuclei. **Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 422, n. 3, p. 185-192, 1993.

MONTIRONI, R.; GALLUZZI, C. M.; DIAMANTI, L.; GIANNULIS, I.; PISANI, E.; SCARPELLI, E. Morphological identification of the patterns of prostatic intraepithelial neoplasia and their significance. **Journal of Clinical Pathology**, v. 53, n. 9, p. 655-665, 2000.

MONTIRONI, R.; MAZZUCCHELLI, R.; SCARPELLI, M. Precancerous lesions and conditions of the prostate. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 963, p. 169-184, 2002.

NAGLE, R. B.; AHMANN, F. R.; MCDANIEL, K. M.; PAQUIN, M. L.; CLARK, V. A.; CELNIKER, A. Cytokeratin characterization of human prostatic carcinoma and its derived cell lines. **Cancer Research**, v. 47, n. 1, p. 281-286, 1987.

NETTO, G. J.; EPSTEIN, J. I. Widespread high-grade prostatic intraepithelial neoplasia on prostatic needle biopsy: a significant likelihood of subsequently diagnosed adenocarcinoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 30, n. 9, p. 1184–1188, 2006.

OBRADOVICH, J.; WALSHAW, R.; GOULLAUD, E. The influence of castration on the development of prostatic carcinoma in the dog: 43 cases (1978-1985). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 1, n. 4, p. 183-187, 1987.

OLIVEIRA, K. S.; ARAÚJO, E. G.; SILVA, L. A. F.; MENEZES, L. B. Alterações prostáticas de cães adultos necropsiados na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás de maio a julho de 2004. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 267-272, 2007.

OLSEN, P. N.; WRIGLEY, R. H.; THRALL, M. A.; HUSTED, P. W. Disorders of the canine prostate gland: pathogenesis, diagnosis and medical therapy. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 9, n. 6, p. 613-623, 1987.

O'MALLEY, B. The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. **Molecular Endocrinology**, v. 4, n. 3, p.363-369, 1990.

O'SHEA, J. D. Studies on the canine prostate gland. II. Prostatic neoplasms. **Journal of Comparative Pathology**, v. 73, p. 244-252, 1963.

OSTERREICH, DENG, W.; JIANG, S.; CUI, X.; IVANOVA, M.; SCHIFF, R.; KANG, K.; HADSELL, D.L.; BEHRENS, J.; LEE, A.V. Estrogen-mediated down-regulation of E-cadherin in breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 63, n. 17, p. 5203-8, 2003.

OWEN, L. N. **TNM classification of tumors in domestic animals**. Geneva: World Health Organization, 1980.

PARK, H. S.; CHEON, J.; CHO, H. Y.; KO, Y. H.; BAE, J. H.; MOON, D. G.; KIM, J. J. In vivo characterization of a prostate-specific antigen promoter-based suicide gene therapy for the treatment of benign prostatic hyperplasia. **Gene Therapy**, v. 10, n. 13, p. 1129-34, 2003.

PEEHL, D. M.; LEUNG, G. K.; WONG, S. T. Keratin expression: A measure of phenotypic modulation of human prostatic epithelial cells by growth inhibitory factors. **Cell and Tissue Research**, v. 277, n. 1, p. 11-18, 1994.

PELLETIER, G.; LUU-THE, V.; HUANG, X. F.; LAPOINTE, H.; LABRIE, F. Localization by in situ hybridization of steroid 5 α -reductase isozyme gene expression in the human prostate and preputial skin. **The Journal of Urology**, v. 160, n. 2, p. 577-582, 1998.

PETROCELLI, T.; LYE, S.J. Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin 43, by estrogen and progesterone. **Endocrinology**, v. 133, n. 1, p. 284-90, 1993.

POULET, F. Evolution de la prostate canine en fonction de l'âge. **Annales de Médecine Vétérinaire**, v. 129, p. 567-584, 1985.

PRINS, G. S. Molecular biology of the androgen receptor. **Mayo Clinics Proceedings**, v. 75, 2000. Supplement, S32-S35.

PRINS, G. S.; JUNG, M. H.; VELLANOWETH, R. L.; CHATTERJEE, B; ROY, A. K. Age-dependent expression of the androgen receptor gene in the prostate and its implication in glandular differentiation and hyperplasia. **Developmental Genetics**, v. 18, n. 2, p. 99-106, 1996.

REYA, T.; MORRISON, S.; CLARKE, M.; WEISSMAN, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 105-111, 2001.

RICHARDSON, G.; ROBSON, C.; LANG, S.; NEAL, D. E.; MAITLAND, N. J.; COLLINS, A. T. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. **Journal of Cell Science**, v. 117, p.3539–3545, 2004.

ROBERTS, J. T.; ESSENHIGH, D. M. Adenocarcinoma of prostate in 40-year-old body-builder **Lancet**, v.2, n. 8509, p. 742, 1986.

ROSOL, T. J.; TANNEHILL-GREGG, S. H.; LEROY, B. E.; MANDL, S.; CONTAG, C. H. Animals models of bone metastasis. **Cancer**, v. 97, p. 748-757, 2003. Supplement, 3.

ROY, A. K.; LAVROVSKY, Y.; SONG, C. S.; CHEN, S.; JUNG, M. H.; VELU, N. K.; BI, B. Y.; CHATTERJEE, B. Regulation of androgen action. **Vitamins and Hormones**, v. 55, p. 309-352, 1999.

RUCH, R.J. The role of *gap* junctional intercellular communication in neoplasia. **Annals of Clinical and Laboratory Sciences**, v. 24, n. 3, p.216-31, 1994.

RUIJTER, E.; VAN DE KAA, C.; MILLER, G.; RUITER, D.; DEBRUYNE, F.; SCHALKEN, J. Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 2, p. 22–45, 1999.

RUSSELL, D. W.; WILSON, J. D. Steroid 5 α -reductase: two genes/two enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, p. 25–61, 1994.

SADI, M. V.; WALSH, P. C.; BARRACK, E. R. Immunohistochemical study of androgen receptors in metastatic prostate cancer. **Cancer**, v. 67, n. 12, p. 3057-3064, 1991.

SAKR, W. A.; GRIGNON, D. J.; CRISSMAN, J. D.; HEIBRUN, L. K.; CASSIN, B. J.; PONTES, J. J.; HAAS, G. P. High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20–69: an autopsy study of 249 cases. **In Vivo**, v. 8, n. 8, p. 439–443, 1994.

SAKR, W. A.; HAAS, G. P.; CASSIN, B. F.; PONTES, J. E.; CRISSMAN, J. D. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. **The Journal of Urology**, v. 150, p. 379–385, 2003.

SALADINO, F.; CARRUBA, G.; QUADER, S. T.; AMOROSO, M.; DI CRISTINA, A.; WEBBER, M. M.; CASTAGNETTA, L. A. Connexin expression in nonneoplastic human prostate epithelial cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 963, p. 213-217, 2002.

SIGNORETTI, S.; PIRES, M.; LINDAUER, M.; HORNER, J. W.; GRISANZIO, C.; DHAR, S.; MAJUMDER, P.; MCKEON, F.; KANTOFF, P. W.; SELLERS, W. R.; LODA, M. p63 regulates commitment to the prostate cell lineage. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 102, n. 32, p. 11355–11360, 2005.

SIGNORETTI, S.; WALTREGNY, D.; DILKS, J.; ISAAC, B.; LIN, D.; GARRAWAY, L.; YANG, A.; MONTIRONI, R.; MCKEON, F.; LODA, M. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. **The American Journal of Pathology**, v. 157, n. 6, p. 1769-1775, 2000.

SLAUGHTER, D. P.; SOUTHWICK, H. W.; SMEJKAL, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. **Cancer**, v. 6, n. 5, p. 963-968, 1953.

SO, A. I.; HURTADO-COLL, A.; GLEAVE, M. E. Androgen and prostate cancer. **World Journal of Urology**, v. 21, n. 5, p. 325-337, 2003.

STRANDBERG, J. D.; BERRY, S. J. The pathology of prostatic hyperplasia in the dog. In: RODGERS, C. H.; COFFEY, D. S.; CUNHA, G.; GRAYHACK, J. T.; HINMAN, F.; HORTON, R (Eds.). **Benign prostatic hyperplasia**. Bethesda, M. D: USPHS, NIH, 1985. Vol 2, p. 109-117.

SUZUKI, H.; SATO, N.; WATABE, Y.; MASAI, M.; SEINO, S.; SHIMAZAKI, J. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 46, n. 6, p. 759–765, 1993.

TAN, B. T.; PARK, C. Y.; AILLES, L. E.; WEISSMAN, I. L. The cancer stem cell hypothesis: A work in progress. **Laboratory Investigation**, v. 86, n. 12, p. 1203–1207, 2006.

TAN, P. H.; TAN, W. H.; TAN, Y.; LIM, C. N.; CHENG, C.; EPSTEIN, J. I. Is high-grade prostatic intraepithelial neoplasia on needle biopsy different in an Asian population: a clinicopathologic study performed in Singapore. **Urology**, v. 68, n. 4, p. 800-803, 2006.

TAPLIN, M. E.; BUBLEY, G. J.; KO, Y. J.; SMALL, E. J.; UPTON, M.; RAJESHKUMAR, B.; BALK, S. P. Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist. **Cancer Research**, v. 59, n. 11, p. 2511–2515, 1999.

TESKE, E.; NAAN, E. C.; Van DIJK, E.; Van GARDEREN, E.; SCHALKEN, J. A. Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increases risk in castrated dogs. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, n. 1-2, p. 251-5, 2002.

THALEN, B. L. B.; FORSBERG, C. L. Treatment of canine benign prostatic hyperplasia with medroxyprogesterone acetate. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 29, p. 221-226, 1993.

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. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 227, v. 1, p. 64-69, 1996.

UMAYAHARA, Y.; KAWAMORI, R.; WATADA, H.; IMANI, E.; IWAMA, N.; MORISHIMA, T.; YAMASAKI, Y.; KAJIMOTO, Y.; KAMADA, T. Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves AP-1 enhancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 23, p. 16433-42, 1994.

VAN DER KWAST, T. H.; TÊTU, B. Androgen receptors in untreated and treated prostatic intraepithelial neoplasia. **European Urology**, v. 30, n. 2, p. 265-268, 1996.

VAN LEENDERS, G. J. I. H.; SCHALKEN, J. A. Stem cell differentiation within the human prostate epithelium: implications for prostate carcinogenesis. **BJU International**, v. 21, p. 35-42, 2001. Supplement, 2.

VELTRI, R. W.; PARTIN, A. W.; MILLER, M. C. Quantitative nuclear grade (QNG): a new image analysis-based biomarker of clinically relevant nuclear structure alterations. **Journal of Cellular Biochemistry**, p. 151-7, 2000. Supplement, 35.

VELTRI, R. W.; PARTIN, A. W.; EPSTEIN, J. E.; MARLEY, G. M.; MILLER, C. M.; SINGER, D. S.; PATTON, K. P.; CRILEY, S. R.; COFFEY, D. S. Quantitative nuclear morphometry, Markovian texture descriptors, and DNA content captured on a CAS-200 Image analysis system, combined with PCNA and HER-2/neu immunohistochemistry for prediction of prostate cancer progression. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 19, p. 249-258, 1994.

VERHAGEN, A. P.; AALDERS, T. W.; RAMAEKER, F. C.; DEBRUYNE, F. M.; SCHALKEN, J. A. Differential expression of keratins in the basal and luminal compartments of rat prostatic epithelium during degeneration and regeneration. **Prostate**, v. 13, n. 1, p. 25-38, 1998.

VERHAGEN, A. P.; RAMAEKERS, F. C.; AALDERS, T. W.; SCHAAFSMA, H. E.; DEBRUYNE, F. M.; SCHALKEN, J. A. Colocalization of basal and luminal cell-type cytokeratins in human prostate cancer. **Cancer Research**, v. 52, n. 22, p. 6182-6187, 1992.

WALSH, P. C.; WILSON, J. D. The induction of prostatic hypertrophy in the dog with androstenediol. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 57, n. 4, p. 1093-7, 1976.

WANG, S.; GARCIA, A.; WU, M.; LAWSON, D. A.; WITTE, O. N.; WU, H. Pten deletion leads to the expansion of a prostatic stem/progenitor cell subpopulation and tumor initiation. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 103, n. 5, p. 1480-1485, 2006.

WANG, Y.; HAYWARD, S.; CAO, M.; THAYER, K.; CUNHA, G. Cell differentiation lineage in the prostate. **Differentiation**, v. 68, n. 4-5, p. 270-279, 2001.

WANG, M. C.; VALENZUELA, L. A.; CHU, T. M. Purification of a human prostate specific antigen. **Investigative Urology**, v. 17, n. 2, p. 159-163, 1979.

WATERS, D. J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia in dogs. **European Urology**, v. 35, n. 5-6, p. 456-8, 1999.

WATERS, D.J.; BOSTWICK, D.G. Prostatic intraepithelial neoplasia occurs spontaneously in the canine prostate. **The Journal of Urology**, v. 157, n. 2, p. 713-6, 1997.

WATERS, D.J.; HAYDEN, D.W.; BELL, F.W.; KLAUSNER, J.S.; QIAN, J.; BOSTWICK, D.G. Prostatic intraepithelial neoplasia in dogs with spontaneous prostate cancer. **Prostate**, v.30, n. 2, p.92-97, 1997.

WATERS, D. J.; SAKR, W. A.; HAYDEN, D. W.; LANG, C. M.; MCKINNEY, L.; MURPHY, G. P.; RADINSKY, R.; RAMONER, R.; RICHARDSON, R. C.; TINDALL, D. J. Workgroup 4: Spontaneous prostate carcinoma in dogs and nonhuman primates. **Prostate**, v. 36, n. 1, p. 64-67, 1998.

WEAVER, A. D. Fifteen cases of prostatic carcinoma in the dog. **The Veterinary Record**, v. 109, n. 4, p. 71-75, 1981.

WEINSTEIN, M. H.; SIGNORETTI, S.; LODA, M. Diagnostic utility of immunohistochemical staining for p63, a sensitive marker of prostatic basal cells. **Modern Pathology**, v. 15, n. 12, p. 1302-1308, 2002.

WHITE, J. W. The present position of the surgery of the hypertrophied prostate. **Annals of Surgery**, v. 18, n. 2, p. 152-188, 1893.

WHITE, R. A. S.; HERRTAGE, M. E.; DENNIS, R. The diagnosis and management of paraprostatic and prostatic retention cystitis in the dog. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 28, p. 551-574, 1987.

WILDING, G. Endocrine control of prostate cancer. **Cancer Survey**, v. 23, p. 43-62, 1995.

WOJNO, K. J.; EPSTEIN, J. I. The utility of basal cell-specific anti-cytokeratin antibody (34BE12) in the diagnosis of prostate cancer. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 19, n. 3, p. 251-260, 1995.

XIN, L.; LAWSON, D.; WITTE, O. The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 102, n. 19, p. 6242–6947, 2005.

YAMASAKI H.; KRUTOVSKIKH, V.; MESNIL, M.; TANAKA, T.; DAGLI, M. L. Z.; OMORI, Y. Role of conexina (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. **Comptes Rendus de l'Academie de Sciences de Paris**, v.322, p.151-159, 1999.

YAMASAKI, H., NAUS, C. Role of connexin genes in growth control. **Carcinogenesis**, v.17, n. 6, p.1199-213, 1996.

YANG, A.; KAGHAD, M.; WANG, Y.; GILLET, E.; FLEMING, M. D.; DOTSCHE, V.; ANDREWS, N. C.; CAPUT, D.; MCKEON, F. p63, a p53 homolog at 3q27–29, encodes multiple products with transactivating, death inducing, and dominant-negative activities. **Molecular Cell**, v. 2, n. 3, p. 305–316, 1998.

ZHONG, W.; PENG, J.; HE, H.; WU, D.; HAN, Z.; BI, X.; DAI, Q. Ki-67 and PCNA expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **Clinical and Investigative Medicine**, v. 31, n. 1, E8-E15, 2008.

LAI, C. L.; VAN DEN HAM, R.; MOL, J.; TESKE, E. Immunostaining of the androgen receptor and sequence analysis of its DNA-binding domain in canine prostate cancer. **The Veterinary Journal**, 2008. No prelo.