

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A ADMINISTRAÇÃO DE
TOXINA BOTULÍNICA “A” E A ORQUIECTOMIA NO
TRATAMENTO DA HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA DO
CÃO.**

Giuliano Queiroz Mostachio
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A ADMINISTRAÇÃO DE
TOXINA BOTULÍNICA “A” E A ORQUIECTOMIA NO
TRATAMENTO DA HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA DO
CÃO.**

Giuliano Queiroz Mostachio

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2008

M915 Mostachio, Giuliano Queiroz
e Estudo comparativo entre a administração de toxina botulínica “A”
e a orquiectomia no tratamento da hiperplasia prostática benigna do
cão / Giuliano Queiroz Mostachio. -- Jaboticabal, 2008
xix, 87 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente
Banca examinadora: Maria Denise Lopes, Maria Isabel Mello
Martins
Bibliografia

1. Hiperplasia prostática benigna. 2. Toxina botulínica A. 3. Cão.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.65:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GIULIANO QUEIROZ MOSTACHIO – nascido na cidade de Ilha Solteira, São Paulo, aos 21 dias do mês de Setembro do ano de 1978, filho de Valdomiro Mostachio e Anail Alves de Queiroz Mostachio. Em Fevereiro de 2003, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Londrina. Durante a graduação realizou inúmeros estágios nas áreas de Clínica Cirúrgica e Teriogenologia de Animais de Companhia. Nos anos de 2004 e 2005 participou do programa de aprimoramento (residência) em Reprodução e Obstetrícia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Em Março de 2006 ingressou no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em nível de Mestrado, obtendo bolsa junto à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

"Livros não mudam o mundo, quem muda o mundo são as pessoas. Os livros mudam as pessoas."

Mário Quintana

"Os grandes acontecimentos do mundo têm lugar no cérebro."

Oscar Wilde

"As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam."

George Bernard Shaw

Dedico

*Aos meus pais, Valdomiro Mostachio e Anail Alves de Queiroz Mostachio,
... sem eles nada teria começado ... e pelo exemplo de luta, amor, amizade,
seriedade e dedicação.
Vocês são especiais.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço aos meus pais **Valdomiro Mostachio** e **Anail Alves de Queiroz Mostachio**, que sempre me apoiaram e incentivaram. Vocês são minhas fontes de amizade, felicidade, segurança e amor. Muito obrigado por terem feito de mim a pessoa que sou hoje e um dia espero poder retribuir todos os sacrifícios que vocês fizeram para que eu pudesse realizar os meus sonhos.

Aos meus irmãos **Giuseppe** e **Anna Karina**, pelo incentivo e força que sempre me deram e por todos os momentos de alegria que passamos juntos.

Ao meu orientador **Prof. Wilter Ricardo Russiano Vicente**, pela orientação, confiança, amizade e competência, inspirando-me à construção da vida profissional, iniciada durante o programa de aprimoramento (residência) e estimulada a continuar na pós-graduação.

À minha namorada **Luciana Domingues de Oliveira**, pela paciência, apoio, amizade e amor. Por todos os momentos de alegria, companheirismo, carinho e por me mostrar que criança e mulher podem coexistir juntas dentro de uma pessoa tão especial. As palavras escritas em qualquer agradecimento sempre serão poucas para expressar meus sentimentos, no entanto, saiba que hoje e sempre estes sentimentos que fazem de mim uma pessoa feliz se expandem, se tornando cada vez mais fortes e sinceros.

Aos meus amigos de república **Estevam (Capivara)**, **Tiago (Siri)**, **Marcelo (Ogrão)**, **Eduardo (Paulado)** e **Thiago (Sapinho)**, com os quais compartilhei de forma harmônica todos esses anos de moradia. Vocês são verdadeiros irmãos e a nossa amizade sempre ficará guardada no coração, pois companheiro é companheiro, pipipi é pipipi.

À **Maricy Apparício** pelo apoio e amizade num momento difícil da minha vida profissional, me abrindo portas numa nova instituição de ensino, além das brincadeiras e momentos de alegria.

Aos amigos de pós-graduação, **Diogo José Cardilli**, **Eliandra**, **Aracéle Elisane Alves**, **Gabriela J. Covizzi**, **Ana Paula Coelho Ribeiro**, **Carla Renata F. Gadelha**,

Tathiana Ferguson Motheo e **Valeska** pelos momentos de descontração, discussões e de ensinamentos.

A **Hanna** (*in memorian*), pelo carinho e motivação em me tornar um veterinário. Você sempre foi e continua sendo uma ótima cadela.....sinto sua falta.....

A todos os professores e funcionários do **Departamento de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária** desta faculdade, pelo auxílio e amizade.

Às professoras **Maria Denise Lopes**, **Maria Isabel Mello Martins**, pelas grandes contribuições na elaboração desta dissertação.

Às professoras **Mirela Tinucci Costa** e **Cíntia Lúcia Maniscalco** por terem participado do meu exame de qualificação contribuindo para a finalização deste trabalho.

À professora **Eunice Oba**, pelo auxílio nas dosagens hormonais.

A todos os colegas do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, pelos agradáveis anos de trabalho, confiança e amizade.

A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização deste trabalho.

E por último, mas não menos importantes, a todos os cães e seus proprietários, pela oportunidade e importante contribuição neste experimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa (processo n° 05/58239-2) e auxílio à pesquisa (processo n° 06/52616-1).

Ao laboratório farmacêutico **Aché** pela disponibilidade da compra da toxina botulínica do tipo A (DYSPO[®]RT).

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	03
2.1. Objetivo Geral.....	03
2.2. Objetivos Específicos.....	03
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	04
3.1. Descrição Anatômica, Funcional e Histológica da Próstata.....	04
3.2. Hiperplasia Prostática Benigna (HPB).....	07
3.3. Toxina Botulínica do Tipo A.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. Animais e Grupos Experimentais.....	30
4.2. Procedimento Anestésico.....	30
4.3. Orquiectomia.....	31
4.4. Toxina Botulínica do Tipo A.....	31
4.4.1. Técnica de Aplicação.....	32
4.5. Dosagens Hormonais.....	33
4.6. Colheita de Sêmen.....	33
4.7. Análise dos Ejaculados.....	34
4.7.1. Análises Macroscópicas.....	34
4.7.2. Análises Microscópicas.....	34
4.7.2.1. Motilidade Espermática.....	34
4.7.2.2. Vigor.....	35
4.7.2.3. Concentração Espermática.....	35

4.7.2.4. Morfologia Espermática.....	35
4.8. Mensuração do Diâmetro e Volume Prostático.....	35
4.8.1. Radiografia Simples e Uretrocistografia Retrógrada.....	36
4.8.2. Ultra-sonografia Prostática.....	37
4.9. Análise Estatística.....	37
5. RESULTADOS.....	39
5.1. Análise dos Animais Orquiectomizados.....	39
5.1.1. Mensuração do Diâmetro e Volume Prostático.....	39
5.1.1.1. Avaliação Radiográfica.....	39
5.1.1.2. Avaliação Ultra-sonográfica.....	41
5.1.2. Mensuração das Dosagens Hormonais.....	43
5.1.3. Variações Hematimétricas, Bioquímicas e Urinálise.....	43
5.2. Análise do Animais Tratados com Toxina Botulínica do Tipo A.....	44
5.2.1. Mensuração do Diâmetro e Volume Prostático.....	44
5.2.1.1. Avaliação Radiográfica.....	44
5.2.1.2. Avaliação Ultra-sonográfica.....	45
5.2.2. Mensuração da Libido, Ereção e Variações Espermáticas.....	50
5.2.3. Mensuração das Dosagens Hormonais.....	54
5.2.4. Variações Hematimétricas, Bioquímicas e Urinálise.....	55
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÕES.....	67
8. REFERÊNCIAS.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
CMA	Acetato de Clormadinona
DES	Dietilestilbrestrol
DHT	Diidrotestosterona
ECP	Cipionato de Estradiol
FDA	Food and Drug Administration
Hc	Porção C-terminal da Cadeia Pesada da Toxina Botulínica A
Hn	Porção N-terminal da Cadeia Pesada da Toxina Botulínica A
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
IPSS	Escore Internacional de Sintomas Prostáticos
KGF	Fator de Crescimento de Ceraticócitos
L	Cadeia Leve da Toxina Botulínica A
NSF	N-etilmaleimida
PSA	Antígeno Prostático Específico
SNAP-25	Proteína Sinaptossomal de Peso Molecular de 25 kDa
SNARE	Soluble NSF-Attachment Protein Receptor
TB-A	Toxina Botulínica do Tipo A
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador β
TZP-4238	17 Alpha-Acetoxy-6-Chloro-2-Oxa-4, 6-Pregnadiene-3, 20-Dione
VAMP	Proteína de Membrana Associada à Vesícula
WIN-49596	Zanoterone

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros prostáticos de 6 cães orquiectomizados, no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2008.....	42
Tabela 2. Valores médios \pm desvio padrão dos níveis séricos de testosterona e diidrotestosterona de 6 cães orquiectomizados, no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2008.....	43
Tabela 3. Valores médios \pm desvios padrão dos parâmetros prostáticos de 6 cães que receberam a administração intra-prostática de 250 U de toxina botulínica do tipo A (Grupo II), no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2008.....	46
Tabela 4. Valores médios \pm desvios padrão dos parâmetros prostáticos de 6 cães que receberam a administração intra-prostática de 500 U de toxina botulínica do tipo A (Grupo III), no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2008.....	48
Tabela 5. Valores médios \pm desvio padrão das características espermáticas dos ejaculados de 6 cães submetidos a administração de 250 U de toxina botulínica A. Jaboticabal – SP, 2008.....	51
Tabela 6. Valores médios \pm desvio padrão das características espermáticas dos ejaculados de 6 cães submetidos a administração de 500 U de toxina botulínica A. Jaboticabal – SP, 2008.....	51

- Tabela 7.** Valores médios \pm desvio padrão das alterações morfológicas dos espermatozoides de 6 cães submetidos a administração de 250 U de toxina botulínica A. Jaboticabal – SP, 2008.....52
- Tabela 8.** Valores médios \pm desvio padrão das alterações morfológicas dos espermatozoides de 6 cães submetidos a administração de 500 U de toxina botulínica A. Jaboticabal – SP, 2008.....53
- Tabela 9.** Valores médios \pm desvio padrão dos níveis séricos de testosterona e diidrotestosterona de 12 cães submetidos a administração de 250 (GII) ou 500 U (GIII) de toxina botulínica do tipo A, no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2008.....54

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação esquemática da anatomia do aparelho reprodutor masculino e localização da glândula prostática em cães.....	05
Figura 2. Representação esquemática das principais alterações prostáticas que propiciam o surgimento dos sinais clínicos em cães	12
Figura 3. Imagem radiográfica de cão em projeção laterolateral direita da região caudal do abdômen com aumento prostático. Visibilização de deslocamento cranial da bexiga (BX) e dorsal do cólon. Notar discreta posição abdominal da próstata (traços brancos), sendo que esta apresenta aumento superior a 70% da distância sacropubiana (medida entre traços pretos).....	14
Figura 4. Representação esquemática da estrutura molecular da toxina botulínica.....	19
Figura 5. Representação esquemática da clivagem da toxina botulínica e suas respectivas subunidades e funções	20
Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de ação da toxina botulínica do tipo A.....	23

Figura 7. Representação esquemática da denervação química produzida pela toxina botulínica do tipo A. A) Acúmulo de vesícula sináptica. B) Desenvolvimento de brotamentos axonais laterais, provenientes da terminação nervosa original em direção aos nódulos de Ranvier. C) Junção neuro-muscular parcialmente restaurada. D) Involução dos brotamentos e recuperação do terminal nervoso aos 63 dias. E) Restabelecimento da transmissão nervosa normal aos 91 dias.....24

Figura 8. Imagem radiográfica simples (A) e uretrocistografia retrógrada (B) de cão em projeção laterolateral direita da região caudal do abdômen mostrando aumento prostático. A) Visibilização de deslocamento cranial da bexiga (BX) e dorsal do cólon, com acentuada compressão deste (setas pretas). Notar discreta posição abdominal da próstata (traços brancos), sendo que esta apresenta aumento superior a 70% da distância sacropubiana (medida entre traços pretos). B) Projeção radiográfica demonstrando grande aumento prostático (setas) antes da orquiectomia. C) Imagem radiográfica contrastada evidenciando redução do diâmetro prostático (setas) após 2 meses da orquiectomia. D) Imagem radiográfica contrastada após 4 meses da orquiectomia, notar maior redução do tamanho da próstata (setas) quando comparada aos tempos anteriores.....40

Figura 9. Representação gráfica das médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos (comprimento craniocaudal, altura dorsoventral e largura) de 6 cães orquiectomizados (Grupo I).....42

Figura 10.	Imagem ultra-sonográfica evidenciando área hiperecogênica (seta) no parênquima prostático canino devido a dispersão da solução de toxina botulínica do tipo A.....	44
Figura 11.	Representação gráfica das médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos (comprimento craniocaudal, altura dorsoventral e largura) de 6 cães que receberam a administração intra-prostática de 250 U de toxina botulínica do tipo A (Grupo II).....	46
Figura 12.	Representação gráfica das médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos (comprimento craniocaudal, altura dorsoventral e largura) de 6 cães que receberam a administração intra-prostática de 500 U de toxina botulínica do tipo A (Grupo III).....	48
Figura 13.	Imagem ultra-sonográfica longitudinal (A) e transversal (B) prostática de um cão antes do tratamento. Ultra-sonografia longitudinal (C) e transversal (D) da próstata após 8 semanas da administração de 500 U de toxina botulínica; notar a redução dos parâmetros. Imagem ultra-sonográfica longitudinal (E) e transversal (F) na 16ª semana após o início do tratamento; observar a estabilidade das variáveis.....	49
Figura 14.	Representação gráfica das médias e desvios padrão das alterações morfológicas dos espermatozoides de 6 cães submetidos a administração intra-prostática de 250 U de toxina botulínica A (Grupo II).....	52

Figura 15. Representação gráfica das médias e desvios padrão das alterações morfológicas dos espermatozoides de 6 cães submetidos a administração intra-prostática de 500 U de toxina botulínica A (Grupo III).....53

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A ADMINISTRAÇÃO DE TOXINA BOTULÍNICA
“A” E A ORQUIECTOMIA NO TRATAMENTO DA HIPERPLASIA PROSTÁTICA
BENIGNA DO CÃO.**

RESUMO - A hiperplasia prostática benigna (HPB) tem início no animal com um a dois anos de idade, sendo que 80% dos cães com cinco anos apresentam evidências histológicas de sua presença. A fisiopatologia da doença não está totalmente compreendida, no entanto, a diidrotestosterona é o principal hormônio envolvido. Recentemente, o efeito da toxina botulínica A (TB-A) foi investigado na próstata, mostrando que esta induz atrofia do parênquima e redução do volume. Como o cão é o único animal doméstico que apresenta esta alteração, este se apresenta como modelo experimental para novos estudos da HPB humana. Com base nisso, este estudo objetivou fornecer informações acerca dos efeitos da TB-A sobre a próstata, libido e qualidade do sêmen, comparando os dados com animais orquiectomizados. Para tanto, 18 cães adultos, com evidências ultra-sonográficas de HPB foram submetidos à castração ou administração de 250 ou 500 U de TB-A, e avaliados durante 16 semanas. A orquiectomia mostrou-se um excelente tratamento para a HPB, promovendo redução de 80% do volume prostático. Aplicação da TB-A não ocasionou alterações significativas na libido, ereção ou qualidade e características seminais. Efeitos locais e sistêmicos também não foram observados. Administração de 250 U da TB-A promoveu redução máxima de 9,4% do volume prostático, entretanto, tal redução não foi significativa. Por outro lado, a administração de 500 U de TB-A reduziu significamente as variáveis comprimento, altura e volume da próstata. Desta forma, o presente ensaio contribui de forma singular e inovadora para o conhecimento dos efeitos desta nova modalidade de tratamento na HPB canina.

Palavras-chave: Cão, Hiperplasia Prostática Benigna, Orquiectomia, Próstata, Sêmen, Toxina Botulínica A.

**COMPARATIVE ANALYSIS BETWEEN BOTULINUM TOXIN A ADMINISTRATION
AND ORCHIECTOMY ON TREATMENT OF CANINE BENIGN PROSTATIC
HYPERPLASIA.**

ABSTRACT – Benign prostatic hyperplasia (BPH) starts the development in animals aging about 1 – 2 years. 80% of 5 years-old dogs have histologic evidences of BPH. Despite the little knowledge concerning about this disease, dihydrotestosterone is the main involved hormone. Recently, the effect of botulinum toxin A (BT-A) on rat and human prostate was investigated, and prostatic parenchyma atrophy and decrease in glandular volume were observed. The dog is one of a few animals that can develop BPH spontaneously and is frequently used as an animal model for human prostatic hyperplasia. Based on that, this study aimed to provide information on BT-A effects on prostate, libido and semen quality, in comparison to orchiectomized dogs. For that, 18 adults dogs, with Ultrasonographic evidences of BPH were submitted to orchiectomy or administration of 250 or 500 U of BT-A, and evaluated along 16 weeks. Orchiectomy presented excellent results on BPH, reducing the prostate volume up to 80%. Administration of BT-A did not significantly interfered on libido, erection or semen characteristics. Local and systemic effects also were not observed. Administration of 250 U of BT-A has promoted a maximum decrease of 9,4% on prostatic volume. However, this reduction was not statistically significant. On the other hand, 500 U of BT-A administration has shown to significantly reduce the length, height and volume of prostate. This way, the present study is an innovative and singular contribution for the knowledge of the effects of BT-A on canine prostate.

KEY-WORDS: Benign Prostatic Hyperplasia, Botulinum Toxin A, Dog, Orchiectomy, Prostate, Semen.

1. INTRODUÇÃO

Diante do aumento da expectativa de vida da população canina e humana nos últimos anos, problemas relacionados à próstata, especialmente a hiperplasia prostática benigna vêm adquirindo extrema importância, pois acomete de 80 a 95% dos cães entre cinco e nove anos. Em homens, 50 e 90% apresentam a doença com 50 e 80 anos de idade, respectivamente. Portanto, esforços no intuito de aprimorar técnicas e terapias para o tratamento desta doença se fazem necessário. Como o cão é o único animal doméstico que manifesta esta alteração, este se apresenta como o melhor modelo experimental para novos estudos da hiperplasia prostática benigna humana.

A orquiectomia bilateral é o tratamento de escolha para os cães acometidos, no entanto, naqueles destinados à reprodução ou onde há contra-indicação, a terapia conservativa é de grande importância. Em pacientes humanos, o tratamento a base de fármacos é a principal terapia, devido a problemas que procedimentos cirúrgicos podem ocasionar principalmente nos que apresentam coagulopatias ou severas alterações cardíacas, pulmonares e renais. Nestes, a administração de toxina botulínica do tipo A intraprostaticamente, tem propiciado excelentes resultados, com uma rápida e segura redução do volume do órgão e da resistência uretral, podendo ficar a regressão da próstata entre 20 e 54,7%. Melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes também foi relatada, além de ser adequada naqueles com riscos por problemas pré-existentes (MARIA et al., 2003; KUO, 2005).

Entretanto, a influência de tal neurotoxina ainda foi pouco estudada no cão, existindo apenas um relato de sua utilização nesta espécie. Segundo CHUANG et al. (2006a), apesar de não ter ocorrido significativa redução do volume da próstata, as avaliações histopatológicas do tecido prostático evidenciaram aumento no número de células apoptóticas neste órgão. No entanto, diferentes doses da toxina botulínica do tipo A e suas respectivas consequências não foram estudadas pelos autores (CHUANG et al., 2006a).

Vale também ressaltar que grande parte dos fármacos utilizados na terapia conservativa provocam efeitos colaterais indesejáveis, entre eles: redução do volume

seminal, diminuição da motilidade espermática, aumento de anomalias morfológicas e indução de alterações fetais. Portanto, em cães destinados à reprodução ou utilizados em programas de criopreservação de gametas, assim como em canídeos selvagens, a toxina botulínica A poderia ser uma alternativa.

Sendo assim, a ausência de dados dos efeitos da toxina botulínica A sobre a qualidade seminal, a libido, concentrações séricas de diidrotestosterona (DHT) e testosterona, além da sua influência sobre o volume e diâmetro prostático no cão motivou e se tornou o principal objeto do nosso estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência da toxina botulínica do tipo A no tratamento da hiperplasia prostática benigna canina.

2.2. Objetivos Específicos

Verificar comparativamente a ação da toxina botulínica A com a orquiectomia bilateral na regressão da hiperplasia prostática benigna do cão.

Avaliar os efeitos da neurotoxina sobre o diâmetro e volume da próstata, sobre a qualidade do sêmen e nas concentrações séricas de testosterona e diidrotestosterona.

Investigar a influência da toxina botulínica A na ereção e libido dos cães.

Pesquisar a possível dose ideal de toxina para o tratamento da hiperplasia prostática benigna canina.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Descrição Anatômica, Funcional e Histológica da Próstata

A glândula prostática, ou próstata, é a única glândula sexual acessória do cão (BARSANTI & FINCO, 1997), sendo um órgão simétrico, de formato ovóide ou esférico, andrógeno-dependente que circunda a uretra totalmente nos cães. A próstata é uma estrutura de consistência elástica tênsl dividida em lóbulos por um sulco dorsal e ventral e por um septo interno irregular de músculo liso. O órgão está localizado predominantemente no espaço retroperitoneal, numa situação imediatamente caudal à bexiga na área do colo vesical, e uretra proximal (Figura 1). A uretra passa através da glândula prostática, num ponto ligeiramente dorsal ao seu centro. A uretra prostática está ligeiramente dilatada dentro do órgão, no entanto, na margem caudal, esta possui um leve estreitamento. O colículo seminal (crista uretral) localizado na parede dorsal da uretra prostática marca o ponto de entrada do ducto deferente. Inúmeros ductos prostáticos ingressam na uretra em toda a sua circunferência, provendo a drenagem do órgão (LATTIMER, 1998).

O tamanho da próstata (peso, altura, comprimento, largura e volume) é muito variável, variação esta que sofre influência da raça e da idade do animal. A glândula prostática é extremamente sensível a influências hormonais, sendo que em animais castrados observa-se uma atrofia de 50% após três semanas e de 70% após nove semanas da orquiectomia (BARSANTI & FINCO, 1997; LATTIMER, 1998).

Do nascimento até os dois meses de idade, período que ocorre a degeneração do úraco remanescente, o órgão se localiza no interior do abdômen, deslocando-se após esta época e assumindo posição na cavidade pélvica (DORFMAN & BARSANTI, 1995). Com o desenvolvimento da maturidade sexual, aumenta de tamanho e na puberdade se encontra limitada dorsalmente pelo reto e ventralmente pela parede abdominal e sínfise púbica. Com o avançar da idade no animal, começa a se deslocar cranialmente devido a um aumento de seu volume ocasionado por hiperplasia e assim,

principalmente em cães idosos, se encontra completamente na cavidade abdominal (DORFMAN & BARSANTI, 1995; BASINGER et al., 1998; LATTIMER, 1998).

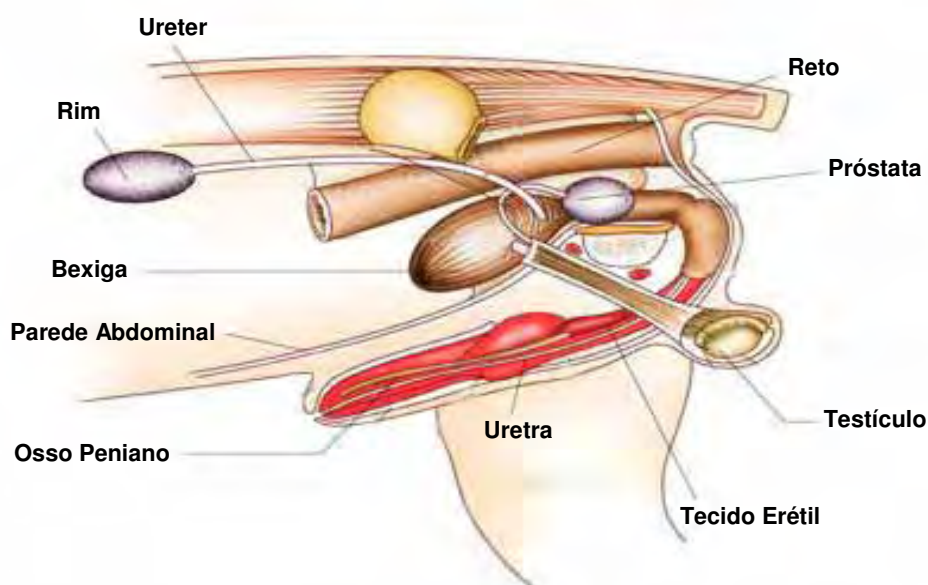


Figura 1. Representação esquemática da anatomia do aparelho reprodutor masculino e localização da glândula prostática em cães (Adaptado de <http://www.pfizerah.com>).

Além de ser dependente da idade do animal, a posição pode variar devido à distensão vesical, conformação do cão e alterações patológicas, como por exemplo, neoplasias e abscedações prostáticas. Em animais obesos, com repleção vesical, ou em casos de alterações prostáticas, esta pode situar-se no interior da cavidade abdominal, fato que deve ser considerado na avaliação do órgão, pois em cães normais, a próstata ocupa menos de 50% do canal pélvico (BARSANTI & FINCO, 1997; BASINGER et al., 1998; LATTIMER, 1998).

O suprimento sanguíneo prostático origina-se da artéria pudenda interna, a qual dá origem à artéria prostática, que na superfície dorsolateral penetra na cápsula

prostática. Fazem parte ainda, as veias uretral e prostática, que através de anastomoses com a veia íliaca interna, são responsáveis pelo retorno venoso (JOHNSTON et al., 2001).

A próstata possui dois tipos de inervação: simpática, controlada pelo nervo hipogástrico, e parassimpática, que está sob o controle do nervo pélvico. A inervação simpática estimula a contração do músculo liso e do epitélio secretor, promovendo conseqüentemente a expulsão do fluído prostático em direção aos ductos prostáticos e uretra. A parassimpática também ajuda na secreção dos líquidos provenientes da próstata. Atualmente, estudos em cães e em humanos sugerem a existência de terminações nervosas opioidinérgicas, as quais podem regular a perfusão vascular local e o tono do estroma prostático (JOHNSTON et al., 2001).

A glândula prostática é responsável pela produção do fluído prostático, o qual fornece ambiente propício para a sobrevivência e motilidade dos espermatozóides durante a ejaculação. Outras funções incluem: participação no controle do fluxo urinário da bexiga devido ao volume de musculatura lisa, contribui com a formação do plasma seminal fornecendo moléculas e enzimas como a fibrolisina, coagulase e outras que facilitam a fertilidade, auxilia no rápido metabolismo da testosterona em diidrotestosterona. No homem observa-se ainda, alto nível de zinco no plasma seminal, com ação antimicrobiana (DORFMAN & BARSANTI, 1995; KUMAR & MAJUMDER, 1995; BARSANTI & FINCO, 1997).

Histologicamente, a próstata canina é dividida em lóbulos, constituídos de glândulas túbulo-alveolares compostas, sustentados por estroma de tecido conjuntivo e musculatura lisa, envolta por uma espessa cápsula fibromuscular (BARSANTI & FINCO, 1997, JOHNSTON et al., 2001). Segundo OLSON et al. (1987) e DORFMAN & BARSANTI (1995) o estroma prostático é composto por fibroblastos e células musculares lisas envoltos por colágeno, com vasos sangüíneos e nervos. As células glandulares presentes na próstata são cúbicas a colunares, dispostas em dupla camada, sendo estas um epitélio secretor colunar alto, que pode se projetar em forma de papilas para o interior da glândula, e o epitélio basal, localizado ao longo da membrana basal. Nos ductos, que se abrem no interior da uretra, o epitélio torna-se do

tipo transicional (DORFMAN & BARSANTI, 1995; BARSANTI & FINCO, 1997). O estroma fibromuscular da próstata canina predomina em animais pré-púberes (entre seis meses e um ano de idade) e, após a maturidade sexual deles, o componente epitelial é mais abundante (BARSANTI & FINCO, 1997).

3.2. Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

As enfermidades prostáticas comumente ocorrem em cães, idosos e não castrados. Entre as diversas alterações que podem ocorrer, a hiperplasia prostática benigna (HPB) é a mais comum. READ & BRYDEN (1995) relataram em um estudo retrospectivo que dos 88 animais que apresentavam alterações na próstata, 58% destas eram compatíveis com HPB. Em outro estudo, OLIVEIRA et al. (1996) avaliando cães encaminhados à necropsia observaram que 84,6% dos animais tinham mudanças nesta glândula, dentre as quais a HPB representou 36,9%. A HPB é condição espontânea e progressiva de aumento do parênquima relacionado com o envelhecimento e com alterações hormonais em cães e humanos (WINTER et al., 1995; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 1997; MURAKOSHI et al., 1998; SIRINARUMITR et al., 2001; SOUZA, 2004). O cão é o único animal doméstico que possui esta alteração, por isso, este é o melhor modelo experimental para o estudo da HPB humana (COCHRAN et al., 1981; LAROQUE et al., 1994; PETER et al., 1995).

A hiperplasia tem início no animal com um a dois anos de idade, sendo que 16% dos cães apresentam evidências histológicas de hiperplasia (aumento no número de células) e hipertrofia (aumento do tamanho da célula) da próstata com dois anos de idade, e sua incidência é maior com o envelhecimento. Mais de 80% dos cães com cinco e 95% com nove anos de idade tinham evidências histológicas de HPB (JOHNSTON et al., 2001; SIRINARUMITR et al., 2001).

Em seres humanos 50 e 90% possuem a doença com 50 e 80 anos de idade, respectivamente (BERRY et al., 1984; COTRAN et al., 1999; CARSON III & RITTMASER, 2003). A HPB humana é nodular, e envolve vários tipos celulares (musculares lisas, fibroblastos, e epitélio glandular), sendo que esta alteração é

caracterizada primariamente por proliferação dos elementos estromais da glândula, promovendo compressão da uretra. O processo se inicia pela proliferação de fibroblastos com posterior envolvimento dos outros elementos celulares. Ao final, os nódulos apresentam arquitetura tecidual variada, sendo comum a observação de áreas arranjadas de maneiras diferentes na mesma glândula (WILSON, 1980). Nos cães, o crescimento prostático envolve principalmente os compartimentos glandulares, produzindo obstrução retal e constipação. No entanto, sinais clínicos são decorrentes do aumento no peso prostático de cães idosos atribuído à proliferação de ambos os compartimentos, tanto o glandular como o estromal (LOWSETH et al., 1990; COHEN et al., 1995; LAROQUE et al., 1995). Segundo alguns autores (OLSON et al., 1987; BARSANTI, 1999) estes dados são controversos, entretanto esta discordância pode estar relacionada com a idade do animal. KLAUSNER et al. (1994) e BARSANTI (1999) sugerem que em cães jovens com cerca de 2,5 anos de idade, esta alteração tem maior envolvimento glandular, enquanto naqueles com mais de cinco anos, ainda que não predomine, o envolvimento estromal é superior.

Outra hipótese para esta divergência em relação à ocorrência de hiperplasia glandular, estromal ou dos dois compartimentos está no fato de que a mesma próstata pode apresentar alterações variadas. OLSON et al. (1987) descreveram que áreas de hiperplasia glandular podem estar associadas a áreas de atrofia do epitélio secretor, nas quais proliferação de elementos estromais está presente, assim como dilatações císticas. Atualmente, JOHNSTON et al. (2000) definem a HPB canina como um aumento dos dois compartimentos, tanto o estromal quanto o glandular.

O desenvolvimento, maturação, função e progressão do tecido prostático à hiperplasia não estão totalmente elucidados; entretanto três características desta afecção são bem definidas. Em primeiro lugar o crescimento prostático é influenciado por hormônios testiculares, sendo que este não ocorre em animais castrados. Segundo, o envelhecimento é um dos fatores, entretanto mesmo que as manifestações clínicas se iniciem normalmente em indivíduos mais velhos, o processo patológico que deu origem aos sintomas pode ter se iniciado anos antes. Por último, apenas o cão e o homem

desenvolvem HPB, sugerindo que exista uma especificidade marcante nestas espécies (WILSON, 1980).

Dentre os fatores hormonais, sabe-se que a testosterona é o principal andrógeno circulante no organismo, e que dá origem a outros dois hormônios: a diidrotestosterona (DHT) e o 17β -estradiol. Atualmente se aceita a DHT como principal hormônio estimulador do aumento dos compartimentos estromal e glandular da próstata. A DHT é o principal andrógeno prostático sintetizado na próstata pela ação de uma enzima localizada principalmente nas células estromais, a enzima 5α -redutase do tipo 2, que pode atuar de forma autócrina ou parácrina nas células epiteliais glandulares (KLAUSNER et al., 1994; MURAKOSHI et al., 1998; STEERS, 2001). Em ambos os tipos celulares, a DHT liga-se a receptores androgênicos nucleares que sinalizam a transcrição de fatores de crescimento para as células epiteliais e estromais (COTRAN et al., 1999). Apesar da testosterona poder estimular o crescimento das células prostáticas, a DHT possui maior afinidade por estes receptores do que a testosterona por dissociar-se mais lentamente (WINTER & LIEHR, 1996; STEERS, 2001).

A fim de comprovar o papel dos andrógenos no desenvolvimento da HPB, inúmeros estudos tentaram produzir experimentalmente esta alteração. WALSH & WILSON (1976) utilizando o hormônio 3α -androstane- 20α -diol (que no organismo se converte em DHT) conseguiram desenvolver HPB em cães castrados. Resultados semelhantes também foram obtidos por TRACHTENBERG et al. (1980), COCHRAN et al. (1981), ISAACS & COFFEY (1981), WINTER et al. (1995) e WINTER & LIEHR (1996). Nos mesmos estudos, observaram que a associação de andrógenos a pequenas doses de 17β -estradiol provocava um maior aumento prostático.

POULET (1985) avaliando a próstata canina em função da idade observou que os níveis plasmáticos de DHT se elevam até o primeiro ano de vida do animal e posteriormente passam a diminuir. Em outro estudo (KLAUSNER et al., 1994), observou-se que os níveis séricos de estrógeno se mantêm durante toda a vida animal, no entanto, assim como o observado por POULET (1985), os níveis de testosterona e DHT declinaram com o passar da idade. Segundo WALSH (1988), estes desequilíbrios hormonais também foram relatados em homens com mais de 60 anos.

BERRY et al. (1986) sugerem que outros fatores possam estar envolvidos no desenvolvimento da HPB, pois é notório que o crescimento prostático continua com o declínio dos níveis de andrógenos. Relatos descrevem que além do andrógeno isoladamente, o sinergismo com estrógenos provoca o aparecimento de hiperplasia em cães (DE KLERK et al., 1979; ISAACS & COFFEY, 1981; LAROQUE et al., 1994; WINTER et al., 1995). WINTER et al. (1995) relataram que o estrógeno pode provocar aumento no número de receptores de andrógenos no tecido prostático ou deterioração das células da glândula pela ação de radicais livres, e assim alterar a resposta a 5 α -redutase. Sabe-se ainda que os estrógenos alteram o metabolismo esteróide aumentando a formação de DHT na próstata e estimulam o crescimento de musculatura lisa, assim como a síntese de colágeno estromal (EWING et al., 1983; POULET, 1985; BARTSCH et al., 1987; WALSH, 1988).

O desbalanceamento entre proliferação e apoptose celular, como consequência dos efeitos dos estrógenos, pode ocasionar o aparecimento da hiperplasia prostática (SOUZA, 2004). A interação entre o componente epitelial e o estromal se altera com o desequilíbrio androgênico, podendo promover um descontrole no desenvolvimento, migração e morte celular, tornando-se assim um dos fatores que contribuem no desenvolvimento da HPB (JANULIS & LEE, 1999). KLAUSNER et al. (1994) observaram que a síntese de DNA e a taxa de renovação celular estavam diminuídas em cães com HPB induzida experimentalmente, hipotetizando assim que se a diferenciação celular for bloqueada, segue-se uma diminuição da taxa de morte celular, promovendo o surgimento de hiperplasia prostática.

Uma das teorias em relação à patogenia da HPB sugere que o controle do crescimento prostático seja influenciado por fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores de crescimento, que são potentes mediadores da proliferação, diferenciação e apoptose celular, estariam relacionados com a parte intrínseca do processo. Dentre eles destacam-se os fatores de crescimento de ceraticócitos (KGF) e o transformador β (TGF- β). O KGF é um importante fator de crescimento e está localizado predominantemente nos fibroblastos. O TGF- β está presente nas células musculares lisas, sendo um potente inibidor do epitélio prostático, induzindo apoptose celular (LEE

et al., 1997). JANULIS & LEE (1999) descreveram que as células epiteliais da próstata possuem receptores para estes dois fatores, indicando que na glândula normal este mecanismo está em equilíbrio. Entre os fatores extrínsecos, podem-se incluir a presença de testículos funcionais, fatores ambientais e genéticos, além da produção de andrógenos por outros órgãos como a adrenal (LEE et al., 1997).

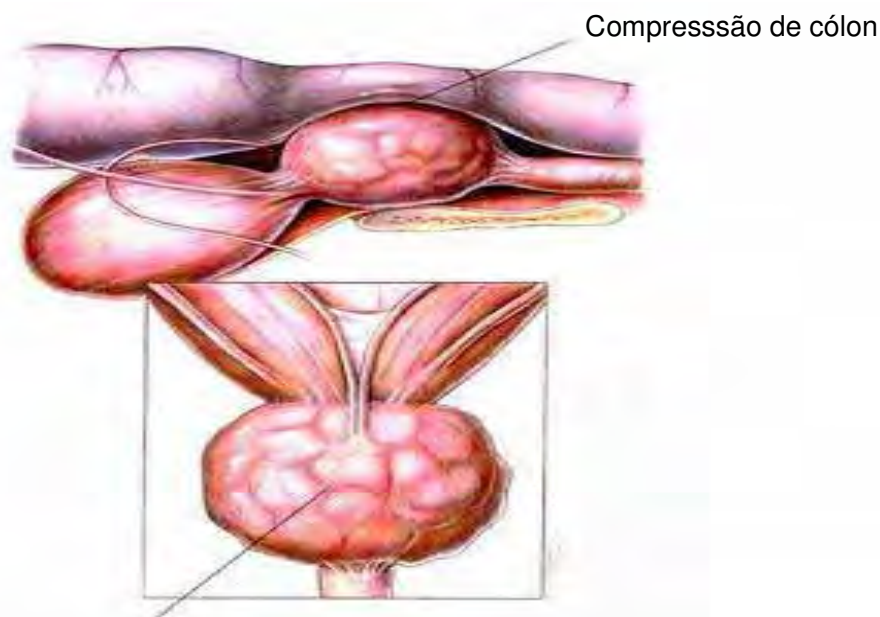
Dentre os fatores ambientais, a presença de linfócitos, oriundos de infiltrado inflamatório não relacionado a microorganismos, deve ser considerado como fator somático para o desenvolvimento da hiperplasia prostática, uma vez que tais células podem promover a proliferação das células estromais e epiteliais, assim como produzir interleucinas e estimular a formação de matriz colágena (LEE et al., 1997).

Histologicamente a HPB está dividida em glandular e complexa (cística). A forma glandular pode anteceder a complexa e ocorre em cães com menos de cinco anos de idade (BRENDLER et al. 1983). Nesta, a próstata aumenta de forma simétrica, onde células secretoras estão proliferando em direção ao lúmen, gerando aumento de volume do ácino como um todo. Histologicamente o que se observa é aumento no número e tamanho das células epiteliais, acompanhadas por menor proliferação, mas ainda assim significativa, de fibroblastos estromais e da musculatura lisa. A hiperplasia complexa ocorre em animais com mais de cinco anos e caracteriza-se por aumento assimétrico, com áreas de hiperplasia glandular entremeadas com áreas de atrofia. Os elementos estromais são proeminentes, principalmente em áreas atróficas. Frequentemente observam-se ácinos dilatados, císticos e preenchidos por material eosinofílico. O revestimento epitelial dos cistos varia podendo apresentar aspecto colunar com citoplasma eosinofílico ou células cubóides sem evidência de capacidade secretora (DE KLERK et al., 1979, BRENDLER et al., 1983; JUNIEWICZ et al., 1994, KLAUSNER et al., 1994).

Há controvérsias na literatura veterinária no que se refere à ocorrência de hiperplasia ou hipertrofia na próstata canina; no entanto, relatos sugerem que ambos estão presentes (OLSON et al., 1987; BARSANTI & FINCO, 1997). Segundo BARSANTI (1999), cães com HPB apresentam marcante aumento no número

(hiperplasia) e no tamanho (hipertrofia) das células epiteliais, sendo o primeiro comumente mais marcante.

Cães com HPB podem ser assintomáticos. Flúido uretral intermitente, de coloração amarelada a hemorrágica, pode ser observado, devido à presença de cistos que se comunicam com a uretra e pelo aumento da vascularização da próstata (JOHNSTON et al., 2001). READ & BRYDEN (1995), observaram que o primeiro sinal clínico da doença é a presença de gotejamento de flúido uretral não associada à urina, onde 20 de 28 cães apresentaram tal alteração como o único sinal clínico. Outros referidos ao aumento prostático incluem hematúria, disúria, tenesmo, fezes ressecadas ou amolecidas com formato laminar, dor abdominal e infertilidade, com maior predominância dos sinais do trato urinário (Figura 2) (READ & BRYDEN, 1995).



Aumento e inflamação prostática

Figura 2. Representação esquemática das principais alterações prostáticas que propiciam o surgimento dos sinais clínicos em cães (Adaptado de <http://www.smallanimalclinic.com>).

No homem, o aumento do compartimento estromal ao redor da uretra provoca principalmente disúria com polaquiúria. Estes sinais são raramente visto nos cães, assim como os sistêmicos.

O diagnóstico presuntivo da hiperplasia prostática benigna é baseado na anamnese, sinais clínicos, exame físico, hematológico, urinálise, avaliação da terceira fração espermática e imagens da próstata. Nenhuma predisposição racial tem sido relatada. Palpação retal revela aumento prostático simétrico, superfície lisa, macia e indolor ao toque (READ & BRYDEN, 1995; BARSANTI & FINCO, 1997; JOHNSTON et al. 2001).

Exame radiográfico abdominal se mostra limitado para caracterização de enfermidades prostáticas quando comparado à ultra-sonografia, no entanto, permite definir tamanho, forma, localização e densidade radiográfica, assim como evidenciar metástases regionais (FEENEY et al., 1987a; LATTIMER, 1998). Na posição ventrodorsal, o diâmetro da próstata normal é raramente superior a dois terços do canal pélvico. Embora nesta posição a porção central da próstata ficar usualmente obscura pela sobreposição do sacro e vértebras caudais, suas margens laterais são freqüentemente visíveis. A próstata normal está localizada caudalmente a bexiga, na cavidade pélvica, com uma medida inferior a 70% da distância entre o promontório do púbis e o sacro. Na hiperplasia, a próstata apresenta aumento superior a 70% da distância sacropubiana, com deslocamento dorsal do cólon e cranial da bexiga (Figura 3) (FEENEY et al. 1987a; OLSON et al., 1987; ATALAN et al. 1999). A uretrocistografia retrógrada pode ser usada para demonstrar prostatomegalia e avaliar e medir a uretra prostática, sendo que na hiperplasia, apresenta-se inalterada ou com estreitamento (FEENEY et al., 1987a).



Figura 3. Imagem radiográfica de cão em projeção laterolateral direita da região caudal do abdômen com aumento prostático. Visibilização de deslocamento cranial da bexiga (BX) e dorsal do cólon. Notar discreta posição abdominal da próstata (traços brancos), sendo que esta apresenta aumento superior a 70% da distância sacropubiana (medida entre traços pretos).

A ultra-sonografia transabdominal é método seguro, não invasivo e sensível para a detecção de afecção prostática intraparenquimatosa, além de permitir avaliar o tamanho, margens e simetria da glândula, e homogeneidade da ecotextura parenquimal (MEDEIROS JR & LUNARDELLI, 2003). Nos animais com HPB revela aumento da próstata, ecogenicidade normal ou aumentada e parênquima homogêneo com ou sem cavitações císticas (FEENEY et al., 1987b).

O diagnóstico definitivo de HPB deve ser realizado através de biópsia da próstata. A aspiração prostática guiada por ultra-som pode ser realizada pelas vias trans-abdominal e periretal, sendo a primeira mais indicada (JOHNSTON et al., 2001). Na hiperplasia prostática benigna nota-se grande número de células semelhantes as

normais, com citoplasma basofílico e com aumento nuclear em relação ao citoplasma (MUZZI, 1998).

O tratamento deve ser indicado somente nos cães com sintomatologia clínica. A orquiectomia bilateral é o tratamento de escolha para HPB. A involução prostática e diminuição dos sinais clínicos iniciam-se após uma semana da realização da orquiectomia. BARSANTI & FINCO (1995) relataram 50% de redução do volume prostático após três semanas da castração e 70 a 75% após nove semanas. Em outro estudo oito de nove cães apresentaram resolução completa dos sinais clínicos após quatro semanas da orquiectomia (READ & BRYDEN, 1995).

A ressecção cirúrgica da próstata não é recomendada como tratamento da hiperplasia prostática benigna. A terapia conservativa, ou seja, medicamentosa, deve ser alternativa ao tratamento cirúrgico nos animais destinados a reprodução ou naqueles onde o estado clínico contra-indica a orquiectomia (SOUZA, 2004).

Os estrógenos podem causar diminuição da próstata e redução dos sinais clínicos por sua atuação na hipófise, inibindo a liberação de gonadotrofina. A administração de dietilestilbrestrol (DES) na dose de 0,1 mg/kg (VO), por cinco dias e de cipionato de estradiol (ECP) na dose de 0,1 mg/kg até um total de 2 mg tem demonstrado involução prostática (BARSANTI & FINCO, 1995). No entanto, tais medicações estão contra-indicadas para o tratamento da HPB, pois, induzem metaplasia escamosa e subsequente estase secretora, a qual pode predispor a próstata a infecções secundárias (SOUZA, 2004). Trombocitopenia, leucopenia e anemia aplásica podem ocorrer devido à supressão da medula óssea após a administração de estrógenos (JOHNSTON et al., 2001).

Os progestágenos, como o acetato de megestrol, acetato de medoxiprogesterona e acetato de clormadinona, atuam na hipófise promovendo diminuição da liberação de gonadotrofina e decréscimo da concentração sérica de testosterona. Acetato de megestrol na dose de 0,5 mg/kg diariamente por quatro a oito semanas promove redução prostática (JOHNSTON et al., 2001). BAMBERG-THALÉN & LINDE-FORSBERG (1993) relataram que após a administração de 3 a 4 mg/kg (SC) de acetato de medoxiprogesterona, com doses sucessivas injetadas com intervalo

mínimo de 10 semanas, ocorreu resolução dos sinais clínicos em 84% dos cães, e destes 63% não apresentaram sinais de doença prostática após 10 meses. Os autores ainda observaram diminuição do tamanho prostático em 53% dos animais após quatro a seis semanas.

Os efeitos colaterais das progestinas sintéticas incluem aumento do apetite, hipotiroidismo e diabetes mellitus (BAMBERG-THALÉN & LINDE-FORSBERG, 1993).

KAWAKAMI et al., (1993) relataram que 2 mg/kg/dia de acetato de clormadinona (CMA), duas vezes ao dia por três ou quatro meses, resultou num decréscimo do volume prostático em quatro semanas, com desaparecimento dos sinais clínicos após 10 dias do início do tratamento. Em outro estudo, a administração de 2 mg/kg de CMA resultou em 63 e 79% de redução do volume da próstata após 56 e 84 dias de tratamento, respectivamente (ORIMA et al. 1995). Resultados semelhantes também foram relatados por KAWAKAMI et al. (1995), SHIMIZU et al. (1995), MURAKOSHI et al. (2001) e YASUSHIRO et al. (2001), onde após o fornecimento de CMA, observaram redução do peso e volume prostático, com marcante atrofia do compartimento glandular e estromal e decréscimo nos níveis hormonais de testosterona e DHT. No entanto, altas doses de CMA provocam diminuição da motilidade e do número total dos espermatozoides, assim como aumento da percentagem de anomalias morfológicas (KAWAKAMI et al. 1993 e 1995, SHIMIZU et al. 1995).

O acetato de osaterona é um anti-andrógeno desenvolvido inicialmente como fármaco terapêutico para a HPB canina, TSUTSUI et al., (2001) administraram 0,2 a 0,5 mg/kg, via oral, por sete dias, e obtiveram acentuada redução de 62% no volume prostático após uma semana de tratamento. Tal redução foi superior à promovida pela orquiectomia (60%) após o mesmo período. Entretanto, após seis meses do final do tratamento, o volume da próstata voltou a valores semelhantes ao início da terapia com acetato de osaterona. Nenhuma mudança foi observada na qualidade do sêmen.

O acetato de delmadinona, que atua como anti-andrógeno, possui pouca eficácia, apresentando excelentes resultados em somente dois de nove cães tratados (READ & BRYDEN, 1995). COURT et al. (1998) avaliando os efeitos deste fármaco sobre a função hipofisária, tolerância à glicose e hormônio do crescimento,

descreveram que após a administração de 1,5 mg/kg ocorreu substancial supressão da concentração plasmática do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), podendo esta diminuição causar sinais de insuficiência de glicocorticóides.

Fármacos experimentais como a TZP-4238 e WIN-49596 provocam redução do tamanho prostático, diminuição da concentração intra-prostática de testosterona e DHT, e decréscimo na função secretora da próstata, respectivamente (TAKEZAWA et al., 1995; JOHNSTON et al., 2001). A flutamida, um antagonista não esteróide dos receptores androgénicos, na dose de 5 mg/kg/dia durante sete semanas promove redução do tamanho prostático entre 10 a 14 dias, mostrando não ter efeitos sobre a libido e produção espermática (JOHNSTON et al., 2001). No entanto, tal fármaco pode causar o aparecimento de ginecomastia (SOUZA, 2004).

Inúmeras drogas inibidoras da enzima 5 α -redutase são descritas na literatura, dentre elas, a finasterida é a mais conhecida. A finasterida, um esteróide sintético, atua na conversão da testosterona em DHT, inibindo a enzima 5 α -redutase tipo 2 (FALLER et al., 1993; CARLIN et al., 1997). Em cães, a administração da droga na dose de 0,1 a 1,0 mg/kg/dia ou uma cápsula de 5 mg para cães entre 5 e 50 kg, promove redução do tamanho prostático entre 40 a 70% após oito a 12 semanas de tratamento (LAROQUE et al., 1994; LAROQUE et al., 1995; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 1997; STRZEZEK et al., 2004). LAROQUE et al. (1995) notaram nas avaliações qualitativas atrofia do epitélio prostático, mais acentuada na região periuretral, a qual foi caracterizada por marcante redução do tamanho do lúmen glandular e das células epiteliais, diminuição no comprimento e complexidade das projeções papilares dentro do lúmen acinar, e perda da atividade secretória. Em outro estudo, SIRINARUMITR et al. (2001) relataram diminuição do diâmetro e volume da próstata em 24 e 52%, respectivamente, após 16 semanas de tratamento; observaram ainda que o percentual de células prostáticas apoptóticas obtidas da terceira fração (prostática) do ejaculado aumentou significativamente após o uso de finasterida.

A concentração sérica de DHT e o volume do sêmen diminuem após o uso de finasterida (COHEN et al., 1995; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 1997; SIRINARUMITR et al., 2001). IGUER-OUADA & VERSTEGEN (1997) descreveram

significativa redução do volume seminal a partir da oitava semana de tratamento, estendendo-se até a vigésima semana. Ainda segundo estes autores, a concentração espermática aumentou significativamente após a administração de finasterida, sendo esta inversamente correlacionada com a diminuição do volume do fluído prostático. Todavia, os níveis séricos de testosterona e outros parâmetros seminais não se alteram.

Recentemente, estudos têm demonstrado a utilidade da toxina botulínica no tratamento da hiperplasia prostática benigna em ratos (DOGGWEILER et al., 1998) e humanos (MARIA et al., 2003; KUO, 2005).

3.3. Toxina Botulínica do Tipo A

Em 1817, Justinus Kerner descreveu pela primeira vez o quadro clínico do botulismo. Esta doença foi assim denominada por ter sido associada à ingestão de salsicha (do latim, *botulus* = salsicha) (BÖNI et al., 2000). O agente etiológico (*Bacillus botulinus*) de tal patologia foi identificado somente no ano de 1895, por Emile Pierre Van Ermengen, após 34 casos de paralisia com três mortes (BENEDETTO, 1999; HUANG et al., 2000a). No entanto, em 1922 esta denominação foi alterada, passando tal agente a ser chamado de *Clostridium botulinum*, uma vez que o termo *bacillus* era utilizado para organismos aeróbicos, e *clostridium* (Kloster, do grego = fio torcido), além de indicar a natureza anaeróbia, refletia também sua morfologia (BENEDETTO, 1999). Ainda na década de 20, a forma não purificada da toxina botulínica foi isolada, no entanto, a sua forma purificada e cristalina foi somente isolada em 1946 pelo Dr. Carl Lamanna (SCHANTZ & JOHNSON, 1997). Em 1949, BURGEN et al. comprovam que o mecanismo de ação da toxina botulínica deve-se ao bloqueio do impulso nervoso na junção neuromuscular, mediante inibição da liberação de acetilcolina.

A toxina botulínica é neurotoxina sintetizada pelo *Clostridium botulinum*, bactéria anaeróbica Gram-positiva, constituída por mistura complexa de proteínas contendo parte tóxica e outras não tóxicas (DOGGWEILER et al., 1998; DRESSLER et al., 2005). Apesar de existirem inúmeros sorotipos de toxina botulínica (A, B, C, D, E, F e G), o tipo A é mais amplamente estudado para fins terapêuticos (DRESSLER et al., 2005). Os

sorotipos possuem similaridade funcional, estrutural e suas seqüências de aminoácidos mostram elevado grau de homologia. Quanto às diferenças entre os sorotipos, relacionam-se ao sítio de atuação, potência e duração do efeito. A toxina botulínica do tipo A é a mais potente, de efeito mais prolongado e mais facilmente obtida em cultura, sendo a primeira a ser isolada na forma cristalina, estável e altamente purificada (HUANG et al., 2000b).

As toxinas botulínicas são sintetizadas como polipeptídeos inativos de cadeia simples com massa molecular de 150 kDa (Figura 4) composta por 2 porções com 50 kDa e 100 kDa, que desenvolvem diferentes papéis no processo de intoxicação celular e conseqüente bloqueio funcional. A ligação com o motoneurônio é realizada pela porção Hc da cadeia pesada, sendo que esta ainda possui duas subcadeias a Hcn e a Hcc. A cadeia Hn é responsável pela internalização e translocação da membrana na célula nervosa (Figura 5) (BORIDIC et al. 1996; AOKI, 2001a, b).

A cadeia-mãe é clivada por uma protease bacteriana semelhante à tripsina, originando assim a forma ativa, que possui uma cadeia leve de 50 kDa (L), a qual está associada a um átomo de zinco, e que se une por uma ligação dissulfídica a uma cadeia pesada de 100 kDa (SHONE & TRANTER, 1995; REITZ et al., 2004; DRESSLER et al., 2005). A cadeia pesada (Figura 5) contém ainda dois domínios funcionais de 50 kDa cada, sendo estes a porção N-terminal (Hn) e C-terminal (Hc) (TURTON et al., 2002).

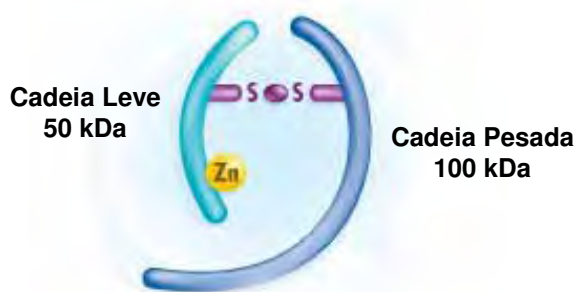


Figura 4. Representação esquemática da estrutura molecular da toxina botulínica (Adaptado de <http://btxa.com>).

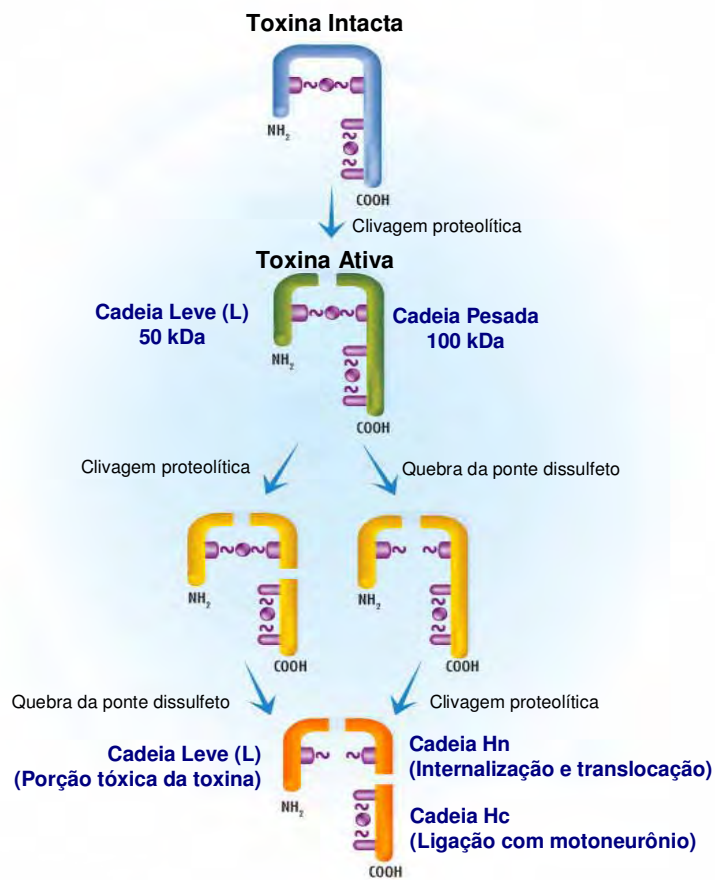


Figura 5. Representação esquemática da clivagem da toxina botulínica e suas respectivas subunidades e funções (Adaptado de <http://btxa.com>).

A inibição da liberação de neurotransmissores promovida pela toxina botulínica é causada pela clivagem específica do receptor conhecido como proteína de ligação do fator sensível à N-etilmaleimida solúvel (SNARE - soluble NSF-attachment protein receptor) (DAVLETOV et al. 2005). O complexo SNARE é uma estrutura protéica pré-formada pela junção da proteína sinaptossomal de peso molecular de 25 kDa (SNAP-25), da proteína de membrana associada a vesícula (VAMP ou sinaptobrevina) e da

sintaxina. Um fator descrito como fator sensível à N-etilmaleimida (NSF) liga-se avidamente a este pré-conjunto formado, dando origem ao complexo SNARE. Este complexo desempenha papel essencial no mecanismo de exocitose, trazendo a vesícula sináptica para a posição próxima à membrana plasmática do neurônio. Para a continuidade do processo de neuro transmissão, a dissociação do complexo SNARE em SNAP e NSF é necessário, e esta quebra ocorre pela ação de uma enzima ATPase (SUDHOF, 1995; DOLLY, 2003).

A toxicidade da toxina botulínica A é resultado de um mecanismo com múltiplas etapas, sendo elas, ligação, internalização e bloqueio neuro-muscular que é exercida pela alta afinidade da toxina com os receptores específicos da parede intracelular do terminal pré-sináptico (SIMPSON, 1980 e 1986; HUMEAU et al. 2000; TURTON et al., 2002).

A primeira etapa descrita é a de ligação. Nesta, a toxina botulínica, através de sua cadeia pesada se liga extracelularmente a estruturas glicoprotéicas em terminais nervosos colinérgicos, ou seja, liga-se à terminação nervosa pré-sináptica (Figura 6) (DAVLETOV et al., 2005; DRESSLER et al., 2005). LI & SINGH (1998) descreveram que a ligação acontece em receptores específicos existentes na membrana da terminação nervosa, sendo este sítio a proteína chamada sinaptotagmina.

A internalização é realizada por endocitose da vesícula lisossomal, processo mediado por receptores, dependente de energia, independente de cálcio e parcialmente dependente da estimulação nervosa (HUGHES & WHALER, 1962; SIMPSON & DASGUPTA, 1983). Ela ocorre 20 minutos após a ligação, sendo máxima depois de 90 minutos (GÖSCHEL, et al. 1997). Neste processo, a ligação dissulfídica que une as cadeias pesada e leve da neurotoxina é essencial, e as duas hélices longas e paralelas na porção Hn da cadeia pesada fazem a mediação do processo de translocação através da membrana, para que a metade tóxica, a cadeia leve, adentre o citoplasma neural onde vai agir (Figura 6) (MONTECUCCO et al., 1996). Se a ponte dissulfeto se quebrar antes da internalização, a cadeia leve não consegue entrar e há perda completa da toxicidade (ZHOU et al., 1995; LI & SINGH, 2000).

A terceira etapa consiste no bloqueio neuro-muscular e esta ocorre sob condições de acidificação (AOKI, 2001b). Esta etapa ocorre intracelularmente pela atividade de metalo-endoprotease da cadeia leve, que promove a clivagem da proteína SNAP-25, uma proteína essencial para a fusão sináptica normal e crescimento do axônio, resultando no bloqueio intracelular da secreção de acetilcolina, conduzindo a uma denervação química temporária, geralmente reversível, e redução da atividade neuronal (DOLLY, 1997; HARPER et al., 2004; REITZ et al., 2004; DAVLETOV et al., 2005; DRESSLER et al., 2005). A propagação do potencial de ação, a despolarização do nervo terminal dos canais de sódio, potássio, e cálcio não são afetados pela toxina (Figura 6) (SPOSITO, 2004).

A toxina botulínica do tipo A não afeta diretamente a síntese ou o armazenamento da acetilcolina ou a condução de sinais elétricos ao longo da fibra nervosa (Figura 7A). Há evidências de que se a denervação química induzida pela toxina tiver duração de três a cinco dias, a transmissão neuromuscular se transforma do estado maduro e estável para a transmissão por sinapses extra juncionais (MEUNIER et al., 2003). Estas sinapses são devidas ao crescimento de brotamentos axonais laterais, provenientes da terminação nervosa original (Figura 7B). Destes brotamentos nervosos se iniciam as novas transmissões sinápticas, restaurando parcialmente o tônus muscular (Figura 7C). Estes brotamentos contêm proteínas necessárias à neuro transmissão, como sinaptotagmina II, sinaptofisina, e canais de cálcio, de sódio e potássio necessários para a condução do potencial de ação. Após 63 dias da aplicação da toxina do tipo A, observa-se a recuperação do terminal nervoso original, dando início à involução dos brotamentos e ao restabelecimento das proteínas de fusão (Figura 7D) (DE PAIVA et al., 1999). Esta regressão dos brotamentos se completa em 91 dias, recuperando neste período as capacidades de endo e exocitose da terminação nervosa original (Figura 7E) (DE PAIVA et al., 1999; DOLLY, 2003).

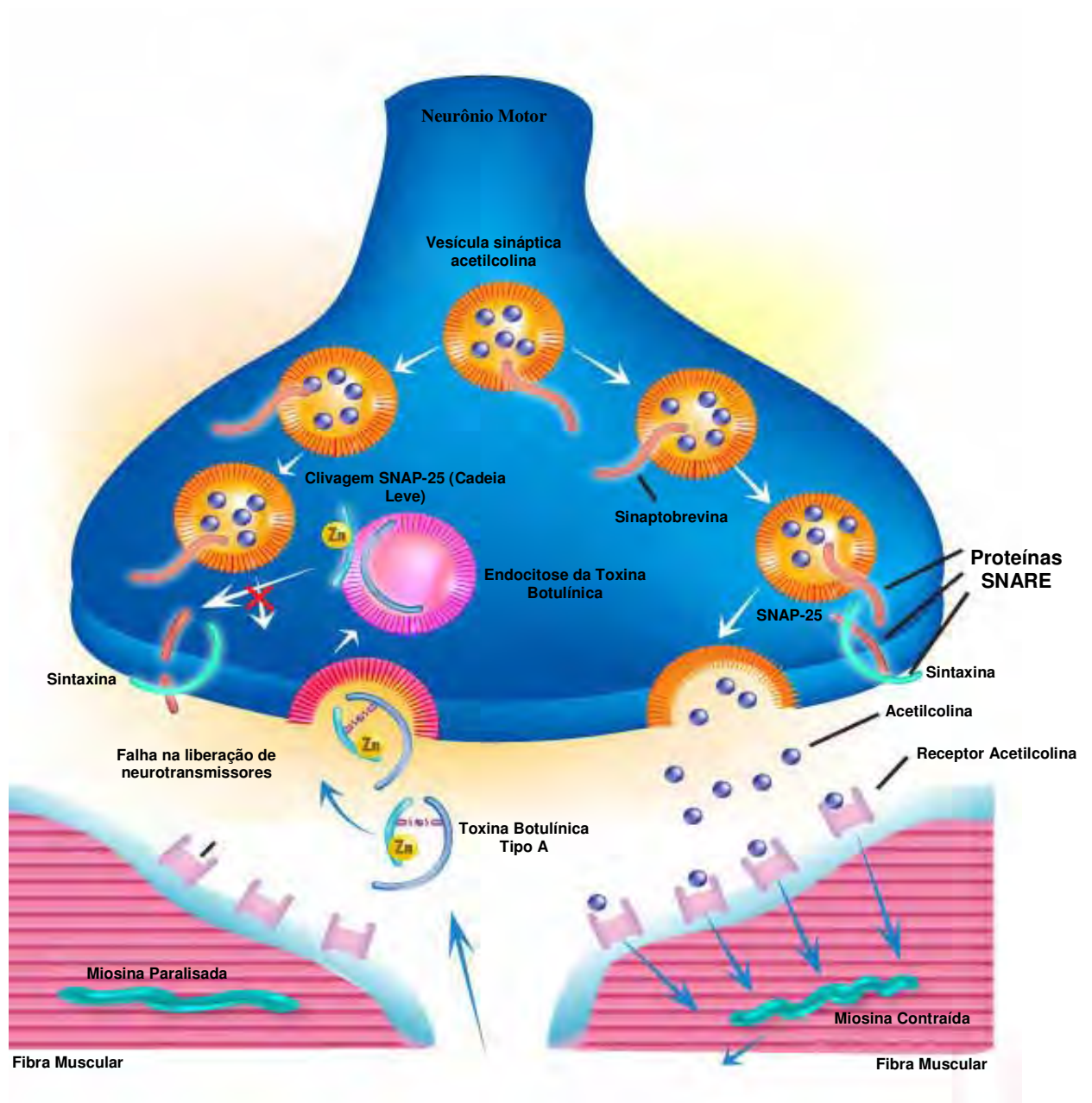


Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de ação da toxina botulínica do tipo A (Adaptado de <http://btxa.com>).

DRESSLER et al. (2005) relataram ainda que a toxina botulínica do tipo A promove o bloqueio de fibras autonômicas para músculos lisos e glândulas exócrinas, e bloqueio de fibras musculares intrafusais, interferindo no reflexo espinal de estiramento.

A administração intramuscular de toxina botulínica acarreta em pequena difusão sistêmica da neurotoxina, no entanto, a sua inativação devido à lentidão em seu transporte axonal retrógrado e ao seu peso molecular (não transpor a barreira hematoencefálica), esta não atinge o sistema nervoso central. Indiretamente, a toxina botulínica promove reversão das alterações da inibição recíproca, da inibição intracortical e de potenciais somatosensoriais (DRESSLER et al., 2005).

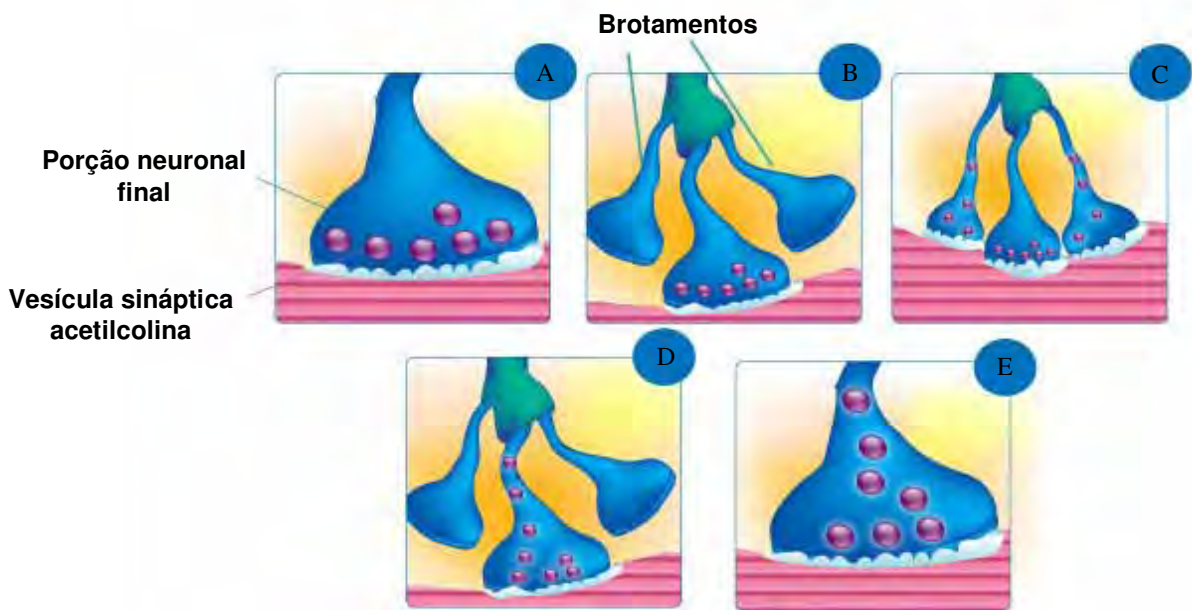


Figura 7. Representação esquemática da denervação química produzida pela toxina botulínica do tipo A. A) Acúmulo de vesícula sináptica. B) Desenvolvimento de brotamentos axonais laterais, provenientes da terminação nervosa original em direção aos nódulos de Ranvier. C) Junção neuro-muscular parcialmente restaurada. D) Involução dos brotamentos e recuperação do terminal nervoso aos 63 dias. E) Restabelecimento da transmissão nervosa normal aos 91 dias (Adaptado de <http://btxa.com>).

Estudos clínicos utilizando técnicas eletromiográficas de fibra única mostraram uma atividade muscular eletrofisiológica aumentada em músculos afastados do ponto de injeção, sem que fosse acompanhada de nenhum sinal ou sintoma clínico. AOKI (2001b) em estudos histológicos mostrou alterações das fibras musculares nas regiões bloqueadas, evidenciando que o raio de ação da toxina a partir do ponto de injeção é em média de 3 cm. Em outra pesquisa ficou esclarecido que a diluição do produto pode influenciar na dispersão. Uma maior diluição aumenta o raio de difusão (MATARASSO, 1998b).

Os efeitos da injeção de toxina botulínica podem ser sentidos entre o terceiro e o décimo dia após a aplicação, estando seu pico de ação entre o quinto e sétimo (SANDERS et al., 1986). Estudos eletromiográficos mostram que a amplitude do potencial de ação dos músculos injetados declina após 48 horas da administração e atinge seu ponto mais baixo com 21 dias (MATARASSO, 1998a). Os mesmos estudos mostraram que 100 dias após a aplicação de toxina botulínica a amplitude dos potenciais de ação continuava reduzida em 80%.

Dependendo da indicação, os efeitos benéficos da administração de toxina botulínica podem perdurar por um período de três a seis meses, sendo que estará na dependência de vários fatores, como dose total utilizada, gravidade do quadro clínico, presença de outros tipos de terapia associada e fatores individuais como capacidade de regeneração neurológica (SANDERS et al., 1986).

Por ser um produto biológico apresentado em unidades biológicas (U), não existe equivalência entre as diferentes apresentações farmacológicas da toxina botulínica do tipo A (FULTON, 1998). Na análise das duas apresentações comerciais, BOTOX[®] (Allergan – EUA) contendo 100 unidades nominais e DYSPORT[®] (Ipsen – Reino Unido) contendo 500 unidades nominais, a relação de equivalência entre os dois produtos variou de 1:3 a 1:4 em seres humanos (ODERGREN et al., 1998; RANOUX et al., 2002; ROSALES et al., 2006). Estudos em ratos sugerem que a taxa de conversão estaria entre 1 unidade de BOTOX[®] para cada 2,5 e 3 unidades de DYSPORT[®] (ROSALES et al., 2006).

As primeiras aplicações terapêuticas da toxina botulínica no homem ocorreram no início de 1980, sendo utilizada no tratamento do estrabismo e blefaroespasma (SCHURCH, 2000; REITZ et al., 2004). Em 1989, após inúmeros estudos e descrição dos métodos de purificação da toxina do tipo A, o FDA (Food and Drug Administration), aprovou, nos Estados Unidos da América, a utilização da neurotoxina botulínica do tipo A para o tratamento do estrabismo, blefaroespasma e espasmo hemifacial (SCHANTZ & JOHNSON, 1997). Na atualidade, a toxina botulínica vem sendo utilizada na terapia da distonia cervical, espasticidade focal, hiperhidrose, dissinergia do detrusor do esfíncter, paralisia cerebral juvenil, fissura anal, acalasia, analgesia, entre outras (MARIA et al., 2003; REITZ et al., 2004; DRESSLER et al., 2005). Recentemente, esta se mostra segura e com alta efetividade no tratamento da hiperplasia prostática benigna humana (MARIA et al., 2003; CHUANG et al., 2005; KUO, 2005; RUSNACK & KAPLAN, 2005; ANTUNES et al., 2007).

Inúmeros trabalhos indicam a efetividade da toxina botulínica do tipo A com finalidade urológica (MARIA et al., 1998; SHURCH et al., 2000; PHELAN et al., 2001; KUO, 2003; HARPER et al. 2004; KUO, 2004; REITZ et al., 2004; SCHURCH & REITZ, 2004; KARSENTY et al. 2006; THOMAS et al. 2006; KUO, 2007). O uso da neurotoxina botulínica para o tratamento da hiperplasia prostática benigna se iniciou em virtude da função prostática ser significativamente influenciada pela inervação autônoma. O componente estático, ou seja, o tecido epitelial prostático (compartimento glandular) está sob controle parassimpático e regulado por andrógenos, enquanto o componente dinâmico, o compartimento estromal, é influenciado simpaticamente. Tais dados evidenciam que a inervação parassimpática colinérgica da próstata é importante na função secretória acinar da glândula e no seu crescimento, enquanto a inervação simpática noradrenérgica está implicada na contração da musculatura lisa do órgão (LEPOR & KUCHAR, 1984; HIGGINS & GOSLING, 1989; PENNEFATHER et al., 2000; VENTURA et al., 2002). Em adição, estudos relataram que receptores adrenérgicos e muscarínicos estão presentes nas células epiteliais e no estroma fibromuscular da próstata humana, estimulando os fatores de crescimento epidermal, transformação e proliferação celular (VAALASTI & HERVONEN, 1980; HEDLUND et al., 1985;

COCKETT et al., 1993; RUGGIERI et al., 1995; RAVINDRANATH et al., 2001). BLOCH et al. (1997) descreveram ainda que o tecido prostático hiperplásico humano apresenta atividade adrenérgica aumentada quando comparada com o órgão normal. Destarte, a injeção de toxina botulínica do tipo A pode inibir a liberação de acetilcolina, inibindo a proliferação celular e também induzir denervação e atrofia do órgão (MARIA et al., 2003; KUO, 2005).

O primeiro estudo referente ao uso da toxina botulínica do tipo A no parênquima prostático foram conduzido por DOGGWEILER et al. (1998). Este mostrou que a administração de toxina botulínica A na próstata de ratos promoveu significativa redução do peso e tamanho do órgão, além de induzir generalizada atrofia com ausência de infiltrados inflamatórios no tecido prostático. Evidências de apoptose e formação de corpos apoptóticos também foram notadas.

Mais recentemente, estudos utilizando esta neurotoxina no tratamento da hiperplasia prostática benigna humana apresentaram excelentes resultados. O primeiro relato desta utilização ocorreu em 2003. Naquele estudo, MARIA et al. (2003) descreveram que após um mês da aplicação de 200 U de toxina botulínica A intraprostaticamente houve redução da concentração sérica de antígeno prostático específico (PSA) em 42%, do volume urinário residual em 60% e do volume prostático em 54% quando comparados com os valores antes do início do tratamento. Relataram também que após dois meses os volumes da próstata e residual de urina, além da concentração sérica de PSA sofreram reduções de 68, 83 e 51%, respectivamente. Observaram ainda que a qualidade de vida, identificada pelo escore de sintomas da Associação Americana de Urologia, melhorou significamente nos pacientes tratados quando comparados com o grupo controle. Nenhum efeito colateral foi descrito por qualquer paciente que recebeu a toxina botulínica.

KUO (2005) utilizando a mesma dosagem de neurotoxina botulínica (200 U) em 10 portadores de hiperplasia prostática benigna, obteve excelentes resultados em 80% dos pacientes, citando significativa redução dos volumes prostático total e urinário residual após três e seis meses do início do tratamento. Nestes pacientes, o fluxo urinário máximo apresentou um aumento significativo de 30%, passando de 7,6 para

11,6 mL por segundo. Descreveu ainda que o volume urinário residual e o volume prostático diminuíram respectivamente de 243 para 36,8 mL e de 65,5 para 49,6 cm³. O autor conclui que em pacientes que apresentam coagulopatias ou severas alterações cardíacas, pulmonares e renais, no quais, procedimentos cirúrgicos estão contraindicados ou naqueles onde tratamentos conservativos falharam, a aplicação de toxina botulínica promoveu uma rápida e segura redução do volume prostático e da resistência uretral.

CHUANG et al. (2005) utilizando 100 U de toxina botulínica do tipo A em 16 pacientes com próstatas pequenas e com evidências de HPB, observaram disúria e leve hematúria após a aplicação da toxina em três pacientes. No entanto, nenhuma complicação ou efeitos sistêmicos adversos foram relatados. Tais pesquisadores relataram também que todos os pacientes apresentaram melhora clínica após uma semana e que esta atingiu efeito máximo um mês após a aplicação. Além disso, após um mês a média do volume prostático, o escore de sintoma, e o índice de qualidade de vida foram significativamente reduzidos em 13,3%, 52,6%, e 44,7%, respectivamente. O fluxo urinário máximo aumentou significativamente em 39,8%, passando de 7,3 para 11,8 mL por segundo. Descreveram ainda que após 10 meses da aplicação da neurotoxina os pacientes apresentavam resultados satisfatórios.

Durante o congresso da Associação Americana de Urologia ocorrido no ano de 2005, LARSON et al. apresentaram um estudo multicêntrico com 40 pacientes, recebendo 100 ou 200 U de toxina botulínica. Os resultados apresentados evidenciaram diminuição do escore internacional de sintomas prostáticos (IPSS) e aumento do fluxo urinário. GUERCINI et al. (2005), durante o mesmo congresso, mostraram dados semelhantes, expondo redução do volume residual urinário e prostático, e aumento do fluxo de urina.

Recentemente CHUANG et al. (2006c) citaram que 31 de 41 homens (76%), que receberam 100 ou 200 U de toxina botulínica do tipo A apresentaram melhora na qualidade de vida. No entanto, em 29% dos pacientes não evidenciou-se redução significativa do volume prostático, entretanto em 58% destes pacientes, o fluxo urinário aumentou. CHUANG et al. (2006b) estudando a funcionalidade da toxina botulínica na

próstata de ratos evidenciou generalizada atrofia prostática, com aumento significativo na taxa de apoptose celular e redução na proliferação das células. Observaram ainda uma redução dose dependente no volume da próstata, sendo que a administração de 5 U promoveu uma diminuição de 24,7%, enquanto a aplicação de 20 U acarretou um decréscimo de 54,8%. No mesmo ano, PARK et al. (2006) obtiveram resultados em humanos semelhantes aos apresentados por MARIA et al. (2003), KUO (2005) e CHUANG et al. (2006a e 2006c).

A primeira pesquisa referente ao uso da toxina botulínica do tipo A no parênquima prostático canino foi conduzido por CHUANG et al. (2006a). Neste estudo comparativo, oito cães adultos receberam 100 U de toxina botulínica A ou solução salina. Os resultados conseguidos não indicaram queda significativa do volume da próstata, entretanto, no exame macroscópico observou-se redução prostática, além desta apresentar consistência mais macia quando comparada com o grupo controle. Avaliações histológicas realizadas com coloração de TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling) revelaram significativa apoptose celular após um e três meses da aplicação da toxina. Nenhuma complicação incluindo infecção, incontinência, retenção urinária ou perda de peso foi observada.

LIN et al. (2007) estudando os efeitos da toxina do tipo A sobre a função contrátil da próstata de cães observaram que após um mês da aplicação de 200 U houve uma diminuição média de 24% no tamanho do órgão e significativa redução da pressão uretral prostática. Tais reduções não foram relatadas nos animais do grupo controle ou naqueles que receberam 100 U intraprostaticamente. Em relação à função contrátil da próstata, os autores evidenciaram que após a administração do fármaco ocorreu uma menor resposta à estimulação. A aplicação de 100 ou 200 U de neurotoxina induziu atrofia da glândula prostática, sendo esta mais pronunciada no grupo de 200 U.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados dezoito (18) machos não castrados da espécie canina, sem raça definida, pesando $21,9 \pm 11,1$ (média \pm desvio padrão), com idade entre três e 11 anos ($7,0 \pm 2,29$), atendidos no Setor de Reprodução e Obstetrícia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal – UNESP, os quais possuíam sintomatologia clínica compatível com alterações prostáticas (gotejamento de fluído uretral não associado à urina, hematuria, tenesmo, fezes com formato laminar) e que ao exame ultra-sonográfico apresentaram diagnóstico presuntivo de hiperplasia prostática benigna. Todos os cães foram submetidos previamente e ao término do experimento a exame clínico detalhado, sendo amostras sangüíneas e urinárias coletadas para avaliação hematimétrica, bioquímica (ALT e creatinina), além de urinálise. Os animais foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

Os cães foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais contendo seis animais cada. No grupo 1 (GI), os animais foram submetidos a orquiectomia bilateral. No grupo 2 (GII), os cães receberam 250 unidades (U) cada de toxina botulínica do tipo A¹, dividida em duas aplicações de igual volume, administradas em cada lobo prostático. Naqueles pertencentes ao grupo 3 (GIII), os mesmos procedimentos descritos para o GII foram realizados, no entanto, estes receberam a administração de 500 U cada de toxina botulínica A.

4.2. Procedimento Anestésico

Os cães de todos os grupos experimentais foram pré-medicados com levomepromazina² (1 mg/Kg, IM) e meperidina (3 mg/Kg, IM) associados na mesma

¹ Dysport® - Aché Laboratórios Farmacêuticos S/A – São Paulo – Brasil

² Neozine® - Sanofi Aventis – São Paulo – Brasil

seringa. Após 15 minutos, a anestesia foi induzida com propofol¹ na dose de 5 mg/Kg de peso corpóreo para a intubação orotraqueal, que foi procedida utilizando-se sonda de Magil de diâmetro adequado ao porte do animal. Posteriormente, os animais foram mantidos com anestesia geral inalatória (isoflurano²) diluída em 100% de oxigênio e fluxo de 30 mL/Kg/min em circuito com reinalação parcial de gases sob ventilação espontânea.

4.3. Orquiectomia

A orquiectomia foi realizada em seis cães submetidos previamente a jejum alimentar de 12 e hídrico de 4 horas. Após anestesia, tricotomia e anti-sepsia de toda a região pré-escrotal, os animais foram acomodados em decúbito dorsal. Uma incisão da pele e tecido subcutâneo, de três a quatro cm, foi realizada na linha média da região pré-escrotal. Após a exteriorização do testículo e liberação de suas inserções escrotais, o cordão espermático foi duplamente ligado com fio Catgute 0 ou 1, de acordo com o porte do animal, e seccionado entre as ligaduras. A túnica vaginal foi então suturada com Catgute 2-0. O mesmo procedimento foi executado no testículo e cordão espermático contralateral. O tecido subcutâneo foi reaproximado com sutura do tipo Cushing e a pele suturada com pontos simples separados utilizando Nylon 2-0. Uma aplicação de Penicilina G-Benzatina³ (40.000 UI/Kg, SC) foi feita imediatamente após o procedimento cirúrgico. No pós-operatório foram realizados curativos diários com iodo povidine. A sutura foi retirada 10 dias após a cirurgia.

4.4. Toxina Botulínica do Tipo A

Previamente a diluição, a toxina botulínica A utilizada era mantida em refrigerador entre 5 e 8 °C, seguindo-se a orientação fornecida pelo fabricante.

¹ Diprivan® - AstraZeneca – São Paulo – Brasil

² Forane® - Abbott Laboratórios do Brasil Ltda – São Paulo – Brasil

³ Benzetacil® - Eurofarma Laboratórios – São Paulo – Brasil

A diluição utilizada para a toxina botulínica A foi a proposta por GARCIA & FULTON (1996), na qual 4,0 mL de solução salina 0,9% é acrescida ao liofilizado, tomando-se o cuidado de usar máscara, luvas e óculos protetor. Preconizou-se também a injeção lenta da solução fisiológica no interior do frasco, evitando-se assim a formação de bolhas (SPOSITO, 2004).

Após a introdução da solução fisiológica, homogeneizou-se delicadamente a suspensão até total dissolução. A homogeneização suave é importante, para que a estrutura conformacional da proteína não seja alterada (GARCIA & FULTON, 1996).

Em virtude da maior parte das pesquisas urológicas serem realizadas utilizando a medicação BOTOX[®] e a dose de 100 ou 200 U, e neste experimento estarmos usando a medicação DYSPORT[®], realizou-se a equivalência dos produtos empregando a taxa de conversão de 1 unidade de BOTOX[®] para cada 2,5 unidades de DYSPORT[®] (ROSALES et al., 2006), promovendo desta maneira o uso das mesmas doses preconizadas pelos trabalhos científicos avaliados, entretanto, utilizando doses de 250 e 500 unidades da toxina botulínica do tipo A.

Reconstituindo 500 U de toxina botulínica A em 4,0 mL de solução fisiológica obtemos a concentração de 12,5 U de toxina botulínica A para cada 0,1 mL de solução ressuspensa.

4.4.1. Técnica de Aplicação

A administração da toxina botulínica A foi realizada em todos os animais do GII e GIII, perfazendo 12 cães. Os animais foram submetidos previamente a jejum alimentar e hídrico de 12 e quatro horas, respectivamente.

Após anestesia, tricotomia da região pré-escrotal e anti-sepsia, os animais foram acomodados em decúbito dorsal. Com o auxílio do aparelho de ultra-som, a glândula prostática foi identificada por via trans-abdominal. Ato contínuo, introduziu-se agulha de calibre (60x10 ou 80x10 mm) adequado ao porte do animal no interior da próstata, e cada lobo dos animais do GII receberam 125 U ou 1,0 mL de toxina botulínica A, totalizando 250 U. Tal procedimento realizou-se também em cada animal do GIII, no

entanto, cada lobo prostático destes cães receberam 250 U ou 2,0 mL de toxina botulínica A. Afim de facilitar a administração da toxina botulínica, procedeu-se a fixação digital do órgão por palpação retal. Uma aplicação de Penicilina G-Benzatina (40.000 UI/Kg, SC) foi realizada imediatamente após o procedimento.

4.5. Dosagens Hormonais

As amostras de sangue foram obtidas antes e depois de quatro, oito e 16 semanas dos procedimentos, sempre no período da manhã (entre 8:30 e 11:30 horas) em todos os grupos experimentais, pela punção da veia jugular nos animais de menor porte e pela veia cefálica nos animais de porte racial maior. Foram usadas agulhas de calibre 25x8 mm, acopladas a seringas de 5 ml, e colhido sangue numa quantidade aproximada de 5 ml a cada 20 minutos, totalizando duas coletas. Após a colheita as amostras foram centrifugadas 1500 g por 10 minutos, e o plasma sanguíneo acondicionado em frascos plásticos (“ependorfe”) de 1,5 ml e congelado a -20°C até o momento das análises.

As concentrações séricas de testosterona e diidrotestosterona foram determinadas por radioimunoensaio (RIA) em fase sólida utilizando-se “kits” comerciais^{1, 2} que marcam os hormônios com iodo radioativo (¹²⁵I).

As amostras foram realizadas em duplicata e as dosagens realizadas em um teste único, utilizando uma única curva de calibração, não tendo desta maneira variação inter-ensaio. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 18%.

4.6. Colheita de Sêmen

A colheita de sêmen foi realizada antes e depois de duas, quatro, oito e 16 semanas da administração da toxina botulínica A nos animais dos grupos II e III, pelo método da estimulação digital (método da mão enluvada), como descrito por

¹ DSL 4000 Active® - Diagnostic Systems Laboratories Inc – Webster – EUA.

² DSL 9600 Active® - Diagnostic Systems Laboratories Inc – Webster – EUA.

JOHNSTON (1991). Antes do início do experimento, todos os cães destes grupos foram condicionados para a colheita do sêmen.

Os ejaculados foram colhidos em tubos plásticos graduados de 10 mL, acoplados a funis plásticos, previamente aquecidos a 37°C. A primeira fração (pré-espermática) foi desprezada, a segunda (espermática) e parte da terceira (prostática) foram colhidas juntamente.

4.7. Análise dos Ejaculados

Imediatamente após a colheita, o tubo contendo o ejaculado foi mantido a 37°C e análise macro e microscópica foi procedida.

4.7.1. Análises Macroscópicas

O volume foi determinado pela graduação do tubo plástico, utilizado na colheita, em mL.

A cor foi determinada pela visualização direta, considerando a cor branca opalescente como normal. Amostras com colorações alteradas foram eliminadas após a investigação do material contaminante.

O pH foi mensurado através de pHmetro digital.

4.7.2. Análises Microscópicas

4.7.2.1. Motilidade espermática

A avaliação foi feita segundo método descrito por KRAUSE (1966), onde uma gota de sêmen fresco é colocada sobre lâmina aquecida (37-38°C) e recoberta por lamínula. O exame foi realizado através de microscopia com aumento de 10X. A porcentagem de células com movimentos progressivos, variou de 0 (todas as células imóveis) a 100 (todas as células em movimento).

4.7.2.2. Vigor

O mesmo procedimento de análise da motilidade foi utilizado, sendo avaliada a qualidade de movimento progressivo dos espermatozóides, pelo escore de 0 (nenhum movimento) a 5 (movimento retilíneo).

4.7.2.3. Concentração espermática

Para a determinação da concentração (número de spz/ml) foi usada uma diluição de 1:200, sendo 5 μ L do ejaculado, em 995 μ L de água. A solução foi utilizada para preencher a câmara hematocimétrica de "Neubauer". Após a sedimentação das células espermáticas, a leitura foi realizada em microscópio, com aumento de 40X, e o número de células contadas foi expresso em espermatozóides por mL.

4.7.2.4. Morfologia espermática

Depois de confeccionados os esfregaços de sêmen em lâmina de vidro, foram fixados em formol salina durante 10 minutos em banho-Maria, a 37°C, secos em temperatura ambiente e corados pelo método de KARRAS modificado por PAPA et al. (1986). Foram avaliadas 100 células espermáticas de cada esfregaço em microscópio, com objetiva de imersão (100X). As alterações morfológicas foram expressas em porcentagem e classificadas em defeitos maiores e menores, segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação do Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998).

4.8. Mensuração do Diâmetro e Volume Prostático

Antes e após quatro, oito e 16 semanas da realização do procedimento de orquiectomia bilateral e da administração da toxina botulínica A, os cães foram

submetidos ao exame radiográfico da região abdominal caudal e ultra-sonográfico da próstata.

4.8.1. Radiografia Simples e Uretrocistografia Retrógrada

Os animais foram submetidos aos exames radiográficos simples e contrastados (uretrocistografia retrógrada). Para tal foi utilizado um aparelho de raios-X com potência máxima de 600mA e 125Kvp, provido de colimador luminoso e mesa de tempo móvel com grade de Potter-bucky, chassi radiográfico com ecrans verde, filmes radiográficos 18x24cm, 24x30cm, 30x40cm ou 35x45cm e proteção radiográfica como avental, protetor de tireóide e luvas plumbíferas.

Os filmes foram identificados empregando-se identificador radiográfico luminoso e processados automaticamente. A técnica radiográfica preconizada variou de acordo com a espessura e região a ser radiografada.

Mantendo os animais posicionados em decúbito lateral direito, com os membros torácicos e pélvicos paralelos entre si e tracionados cranial e caudalmente, respectivamente, realizou-se o exame radiográfico simples. O feixe de raios-X foi centrado na região púbica, delimitado pela terceira ou quarta vértebra lombar e caudalmente pela face caudal da coxa do animal.

A avaliação da próstata pelo exame radiográfico simples consistiu na determinação da sua localização (abdominal ou pélvica), do seu tamanho, da regularidade do contorno, da densidade radiográfica e das alterações associadas às estruturas adjacentes à glândula. Com base nas citações de FEENEY et al. (1987a) e ATALAN et al. (1999) realizou-se a mensuração do tamanho prostático, sendo o diâmetro obtido comparando-se a medida da distância entre o promontório do púbis e o sacro, com a dimensão craniocaudal da próstata, onde a glândula normal não deverá ultrapassar 70% desta distância (sacropubiana). Os demais aspectos radiográficos foram avaliados segundo LATTIMER (1998).

Posteriormente, com o animal ainda em decúbito lateral direito, foi inserida uma sonda uretral flexível para o esvaziamento da bexiga urinária e posterior realização da

uretrrocistografia retrógrada. Para a mesma, realizou-se a infusão de contraste iodado diluído em solução fisiológica 0,9% na proporção de 1:2, respectivamente. Com a bexiga repleta, a sonda foi deslocada e sua extremidade reposicionada caudal ao osso peniano. Após compressão mecânica da glândula, com o auxílio de uma seringa, foi injetado lentamente um volume aproximado de 2 a 7 mL de contraste iodado sem diluição, dependendo do porte do animal, para produzir distensão da mesma. Nesse momento, promoveu-se a exposição radiográfica.

A uretrrocistografia retrógrada teve como objetivo delimitar a simetria glandular periuretral, a regularidade da superfície interna da uretra e o refluxo prostático anormal. A técnica e os critérios de avaliação da uretra prostática foram feitos com base no estudo de JOHNSTON et al. (1995).

4.8.2. Ultra-Sonografia Prostática

Mantendo os cães em decúbito dorsal, procedeu-se a ultra-sonografia por via trans-abdominal, utilizando um aparelho de ultra-som¹ com modo bidimensional em escala de cinza e transdutores microconvexo de 5,0MHz e 7,5MHz, a fim de obter, de cada animal, imagens longitudinais e transversais. Por essas imagens foi possível avaliar o contorno, ecotextura, homogeneidade do parênquima e mensurar o comprimento craniocaudal (C), a largura transversa (L), e a altura dorsoventral (A) da próstata. O volume prostático foi obtido através da fórmula: $\text{volume} = (1/2,6 \times C \times L \times A) + 1,8$, preconizada por SIRINARUMITR et al. (2001). Para facilitar o exame foi realizada palpação retal, com a fixação digital do órgão e os dados ultra-sonográficos obtidos pelo mesmo operador (ultra-sonografista).

4.9. Análise Estatística

No experimento foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, composto por 3 tratamentos e 6 animais por tratamento, totalizando 18 animais. Os

¹ Águila Vet – Esaote PieMedical – Holanda.

dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *t* de Student pareado, empregado para comparação de médias entre os diferentes tempos dentro do mesmo grupo.

O teste de Tukey foi usado para comparação de médias, entre os grupos, obtidas durante cada tratamento.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa SAS System¹ (SCHLOTZHAUER & LITTELL, 1997). Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

¹ SAS System (Statistical Analysis System) Version 9.0 – SAS Institute Inc., Cary, NC, USA

5. RESULTADOS

Os 18 animais selecionados para compor os grupos experimentais apresentavam sinais clínicos, radiográficos e ultra-sonográficos compatíveis com hiperplasia prostática benigna. Os principais sinais clínicos observados antes do início dos tratamentos foram: hematúria, sangramento espontâneo pelo pênis e dificuldade de defecação, correspondendo estes a 55, 23 e 15% das alterações, respectivamente.

Segundo os dados obtidos durante a realização do experimento, os sinais clínicos observados pelos proprietários cessaram em média após uma semana do procedimento de orquiectomia. Nos animais que compunham os grupos II e III, os quais receberam respectivamente 250 e 500 U de toxina botulínica A, os sinais clínicos cessaram em média após duas semanas da administração da medicação.

Os demais resultados obtidos no presente ensaio estão apresentados distintamente em duas partes. A primeira refere-se aos animais orquiectomizados (Grupo I). A segunda parte engloba os achados da administração de 250 e 500 U de toxina botulínica do tipo A nos grupos II e III, respectivamente.

5.1. Análise dos Animais Orquiectomizados

5.1.1. Mensuração do Diâmetro e Volume Prostático

5.1.1.1. Avaliação Radiográfica

Ao exame radiográfico simples o aumento de volume prostático foi visibilizado pelo deslocamento cranial da bexiga e deslocamento dorsal do cólon (Figura 8A). Exceto em um animal onde a próstata não foi visibilizada, todos os outros cães apresentaram dimensões prostáticas craniocaudais na projeção radiográfica laterolateral, ultrapassando 70% da medida entre o promontório do púbis e o sacro. Na uretrocistografia retrógrada também foi possível visibilizar as mesmas alterações observadas ao exame radiográfico simples, além de pequena perda de simetria da

uretra prostática em dois animais do grupo I, as quais não foram visibilizadas ao final das avaliações.

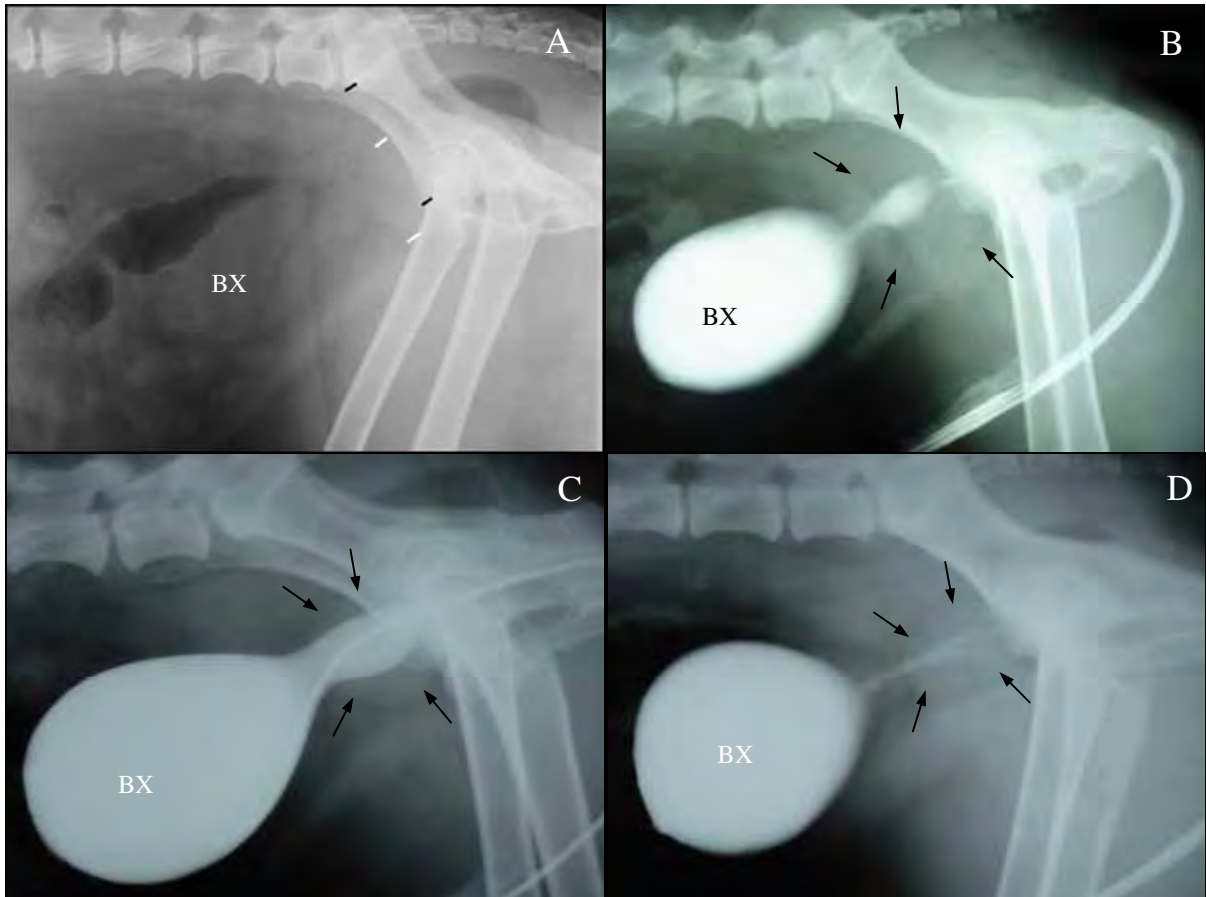


Figura 8. Imagem radiográfica simples (A) e uretrocistografia retrógrada (B) de cão em projeção laterolateral direita da região caudal do abdômen mostrando aumento prostático. A) Visibilização de deslocamento cranial da bexiga (BX) e dorsal do cólon, com acentuada compressão deste (setas pretas). Notar discreta posição abdominal da próstata (traços brancos), sendo que esta apresenta aumento superior a 70% da distância sacropubiana (medida entre traços pretos). B) Projeção radiográfica demonstrando grande aumento prostático (setas) antes da orquiectomia. C) Imagem radiográfica contrastada evidenciando redução do diâmetro prostático (setas) após 2 meses da orquiectomia. D) Imagem radiográfica contrastada após 4 meses da orquiectomia, notar maior redução do tamanho da próstata (setas) quando comparada aos tempos anteriores.

Nas avaliações radiográficas (simples e uretrocistografia retrógrada) dos animais orquiectomizados foi possível após quatro, oito e 16 semanas notar visualmente redução da glândula prostática, com uma medida inferior a 70% da distância entre o promontório do púbis e o sacro, assim como retorno da próstata a cavidade pélvica e ausência de deslocamento do cólon (Figura 8B, C, D). Alterações de regularidade de contorno e de densidade radiográfica, caracterizadas por distorções de radiopacidade, não foram observadas ao exame no início, durante e ao final do experimento em todos os cães do grupo I.

5.1.1.2. Avaliação Ultra-sonográfica

Prostatomegalia e alterações parenquimais foram observadas ao exame ultra-sonográfico, consistindo em aumento simétrico, ecotextura variando de lisa a áspera e ecogenicidade mista. Pequenas lesões cavitárias (cistos) intraparenquimais também foram evidenciadas por ultra-som em todos os animais.

Após quatro semanas da orquiectomia, a ultra-sonografia trans-abdominal revelou significativa redução dos parâmetros volume, comprimento e largura prostática (Tabela 1). Comparando os dados obtidos com os valores iniciais, a média do volume prostático, comprimento craniocaudal e largura transversa da próstata apresentaram significativa redução de 64,4% (de $40,49 \pm 28,31$ para $13,60 \pm 9,95$ cm³, $p < 0,001$), 38,7% (de $4,73 \pm 1,57$ para $2,90 \pm 1,30$ cm, $p < 0,001$) e 37,1% (de $4,89 \pm 1,21$ para $3,08 \pm 0,95$ cm, $p < 0,001$), respectivamente.

Na oitava e décima sexta semana, as variáveis observadas, inclusive a altura dorsoventral, sofreram novas reduções, sendo estas significativas quando confrontadas aos valores basais (tempo 0). Após 16 semanas da orquiectomia, obteve-se uma redução dos parâmetros volume, comprimento, altura e largura da próstata de 80,5, 51,8, 41,6 e 48,3%, respectivamente.

As médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos dos seis animais estudados, antes e após a orquiectomia, estão representados na Figura 9.

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros prostáticos de 6 cães orquiectomizados, no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2008.

Semanas	Comprimento	Altura	Largura Transversa (cm)	Volume (cm ³)
	Craniocaudal (cm)	Dorsoventral (cm)		
0	4,73 \pm 1,57 ^A	3,64 \pm 1,27 ^A	4,89 \pm 1,21 ^A	40,49 \pm 28,31 ^A
4	2,90 \pm 1,30 ^B	2,61 \pm 1,00 ^{AB}	3,08 \pm 0,95 ^B	13,60 \pm 9,95 ^B
8	2,42 \pm 0,99 ^B	2,17 \pm 0,80 ^B	2,66 \pm 0,77 ^B	8,58 \pm 5,53 ^B
16	2,28 \pm 0,93 ^B	2,13 \pm 0,78 ^B	2,53 \pm 0,72 ^B	7,88 \pm 5,03 ^B

A, B – Médias na mesma coluna com uma letra maiúscula em comum não diferem significativamente entre si pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

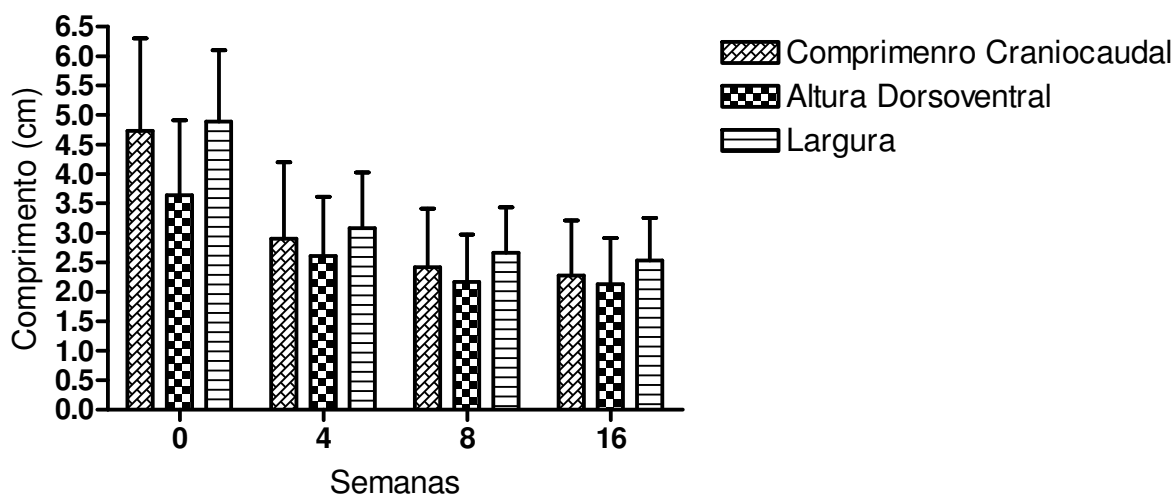


Figura 9. Representação gráfica das médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos (comprimento craniocaudal, altura dorsoventral e largura) de 6 cães orquiectomizados (Grupo I).

5.1.2. Mensuração das Dosagens Hormonais

A concentração sérica média de testosterona e diidrotestosterona antes do tratamento nos animais do GI era de $2,90 \pm 0,73$ ng/mL (entre 2,07 e 3,65 ng/mL) e $706,18 \pm 339,33$ pg/mL (entre 347,52 e 1022,15 pg/mL), respectivamente. Após quatro semanas da orquiectomia, os níveis sanguíneos destes hormônios apresentaram significativa redução. Tais efeitos foram mantidos durante o período experimental.

Os resultados das concentrações séricas de testosterona e DHT estão apresentados na Tabela 2.

5.1.3. Variações Hematimétricas, Bioquímicas e Urinálise

Os resultados hematimétricos, bioquímicos (ALT e creatinina) e urinálise obtidos dos animais no início, durante e ao final das avaliações permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie (KANEKO, 1997).

Tabela 2. Valores médios \pm desvio padrão dos níveis séricos de testosterona e diidrotestosterona de 6 cães orquiectomizados, no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2008.

Semanas	Testosterona (ng/mL)	Diidrotestosterona (pg/mL)
0	$2,90 \pm 0,73^A$	$706,18 \pm 339,33^A$
4	$< 0,1^B$	$282,54 \pm 83,38^B$
8	$< 0,1^B$	$271,13 \pm 146,49^B$
16	$< 0,1^B$	$189,09 \pm 112,68^B$

A, B – Médias na mesma coluna com uma letra maiúscula em comum não diferem significativamente entre si pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

5.2. Análise dos Animais Tratados com Toxina Botulínica do Tipo A

O método de administração da toxina botulínica A mostrou-se seguro e de baixa complexidade. A progressão da agulha no parênquima prostático e os locais de injeção da toxina (Figura 10) foram facilmente controlados pela ultra-sonografia trans-abdominal.

Nenhuma complicação local ou efeitos sistêmicos foram observados após a administração da neurotoxina. Hematúria ocasional foi notada nas primeiras 24 horas após a injeção em dois animais, entretanto, esta alteração resolveu-se espontaneamente e no decorrer do período de observação nenhum sinal macroscópico de sangue foi notado durante a micção dos cães. Os exames prostáticos realizados através de toque retal revelaram que a próstata se encontrava mais macia após a administração de toxina botulínica do que no início do tratamento.

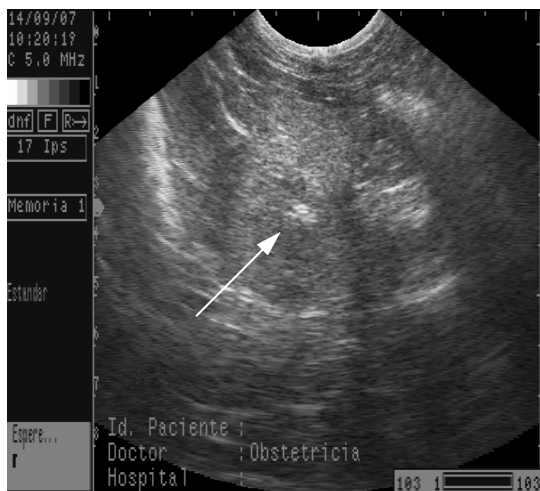


Figura 10. Imagem ultra-sonográfica evidenciando área hiperecogênica (seta) no parênquima prostático canino devido a dispersão da solução de toxina botulínica do tipo A.

5.2.1. Mensuração do Diâmetro e Volume Prostático

5.2.1.1. Avaliação Radiográfica

Assim como nos animais pertencentes ao grupo I, as avaliações radiográficas dos 12 cães que compunham os grupos II e III mostraram deslocamento cranial da

bexiga e dorsal do cólon, com dimensões prostáticas superiores a 70% da medida entre o promontório do púbis e o sacro. Durante a uretrocistografia retrógrada foi observado refluxo do meio de contraste para a próstata na primeira avaliação em um dos animais do grupo III, sendo este não mais identificado durante e ao final das observações.

Diferentemente do grupo de animais orquiectomizados, não foi possível notar visualmente a redução da glândula prostática. Este resultado possivelmente ocorreu devido a menor redução de parâmetros que a administração da neurotoxina botulínica proporcionou aos animais dos grupos II e III. Alterações de radiopacidade e contorno não foram observados.

5.2.1.2. Avaliação Ultra-sonográfica

Ao exame ultra-sonográfico inicial dos animais dos grupos II e III foi visibilizado aumento prostático simétrico, micro cistos intraparenquimais e parênquima de ecogeneidade mista. Evidenciou-se que durante as 16 semanas de avaliação dos cães que receberam 250 ou 500 U de toxina botulínica do tipo A ocorreu um decréscimo das lesões cavitárias (cistos) intraparenquimais e aumento na homogeneidade do parênquima prostático. Áreas de necrose nos locais de aplicação da toxina botulínica não foram observadas durante os exames ultra-sonográficos da próstata.

A administração de 250 U de toxina botulínica A nos animais do grupo II não provocou mudanças significativas nas variáveis comprimento, altura e largura da próstata. Após quatro, oito e 16 semanas da aplicação nos cães pertencentes ao grupo II observou-se uma ligeira redução de 6,9, 9,4 e 8,1%, respectivamente no volume prostática, entretanto, esta redução não foi significativa. As médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos dos seis animais estudados, antes e após ministrar TB-A, estão apresentados e representados na Tabela 3 e Figura 11, respectivamente.

Tabela 3. Valores médios \pm desvios padrão dos parâmetros prostáticos de 6 cães que receberam a administração intra-prostática de 250 U de toxina botulínica do tipo A (Grupo II), no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2008.

Semanas	Comprimento	Altura	Largura Transversa (cm)	Volume (cm ³)
	Craniocaudal (cm)	Dorsoventral (cm)		
0	3,39 \pm 0,60 ^A	3,09 \pm 0,44 ^A	3,76 \pm 0,49 ^A	17,70 \pm 6,34 ^A
4	3,28 \pm 0,58 ^A	3,05 \pm 0,45 ^A	3,64 \pm 0,50 ^A	16,48 \pm 5,98 ^A
8	3,27 \pm 0,59 ^A	3,03 \pm 0,41 ^A	3,56 \pm 0,52 ^A	16,04 \pm 5,80 ^A
16	3,30 \pm 0,57 ^A	3,05 \pm 0,40 ^A	3,57 \pm 0,49 ^A	16,26 \pm 5,75 ^A

A, B – Médias na mesma coluna com uma letra maiúscula em comum não diferem significamente entre si pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

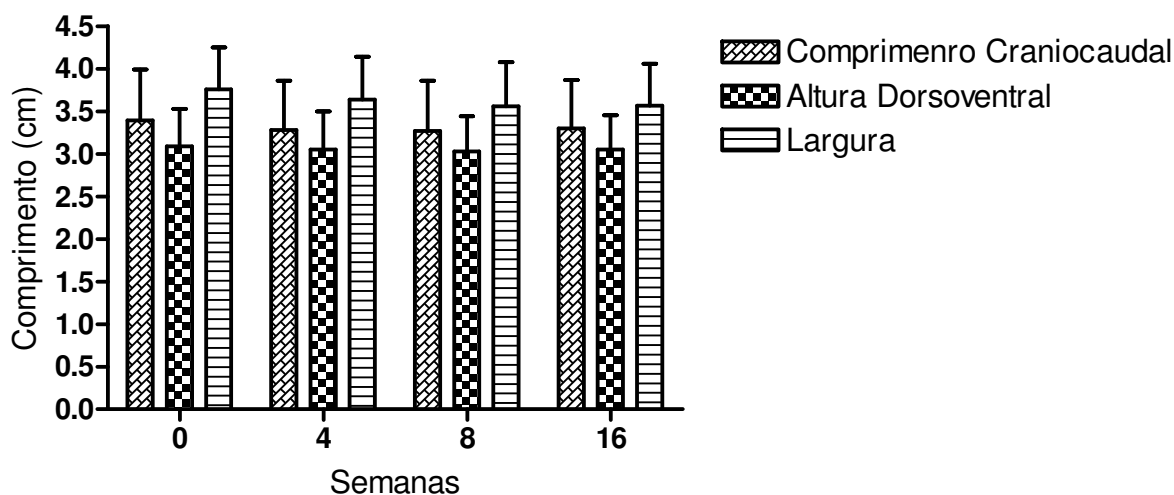


Figura 11. Representação gráfica das médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos (comprimento craniocaudal, altura dorsoventral e largura) de 6 cães que receberam a administração intra-prostática de 250 U de toxina botulínica do tipo A (Grupo II).

A média do volume prostático dos animais que receberam 500 U de toxina botulínica do tipo A (grupo III) no início do experimento era de $32,18 \pm 8,61 \text{ cm}^3$. Após quatro semanas da administração da neurotoxina o volume da próstata regrediu em todos os cães pertencentes a este grupo, causando uma redução significativa de 24,3% na média do volume da glândula prostática (de $32,18 \pm 8,61$ para $24,36 \pm 5,76$, $p < 0,01$, Tabela 4). A altura dorsoventral da próstata também apresentou diminuição significativa após quatro semanas, passando de $4,02 \pm 0,39$ para $3,54 \pm 0,35 \text{ cm}$ ($p < 0,05$). As demais variáveis, comprimento e largura, não apresentaram reduções significativas neste período (Tabela 4).

Na oitava semana de avaliação observou-se uma mudança significativa no parâmetro comprimento prostático. Comparando os dados obtidos com os valores basais (tempo 0), a média do comprimento passou de $3,94 \pm 0,44$ para $3,49 \pm 0,33 \text{ cm}$ ($p < 0,05$, Tabela 4). As variáveis volume e altura da glândula prostática permaneceram significativamente reduzidas neste período, atingindo o volume sua redução máxima (29,8%) durante o período experimental.

Após 16 semanas da administração de toxina botulínica A nos animais do grupo III, os resultados foram mantidos, permanecendo as reduções apresentadas pelo volume, comprimento e altura estatisticamente significativas.

As médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos dos seis animais estudados, antes e após a aplicação de 500 U de toxina botulínica, estão representados na Figura 12.

As imagens ultra-sonográficas de um dos cães pertencente ao grupo III, demonstrando as reduções dos parâmetros comprimento, altura e largura prostática estão apresentadas na Figura 13.

Tabela 4. Valores médios \pm desvios padrão dos parâmetros prostáticos de 6 cães que receberam a administração intra-prostática de 500 U de toxina botulínica do tipo A (Grupo III), no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2008.

Semanas	Comprimento	Altura		Volume (cm ³)
	Craniocaudal (cm)	Dorsoventral (cm)	Largura Transversa (cm)	
0	3,94 \pm 0,44 ^A	4,02 \pm 0,39 ^A	4,90 \pm 0,44 ^A	32,18 \pm 8,61 ^A
4	3,56 \pm 0,35 ^{AB}	3,54 \pm 0,35 ^B	4,59 \pm 0,34 ^A	24,36 \pm 5,76 ^B
8	3,49 \pm 0,33 ^B	3,43 \pm 0,33 ^B	4,44 \pm 0,41 ^A	22,58 \pm 5,53 ^B
16	3,51 \pm 0,29 ^B	3,43 \pm 0,33 ^B	4,46 \pm 0,44 ^A	22,74 \pm 5,53 ^B

A, B – Médias na mesma coluna com uma letra maiúscula em comum não diferem significamente entre si pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

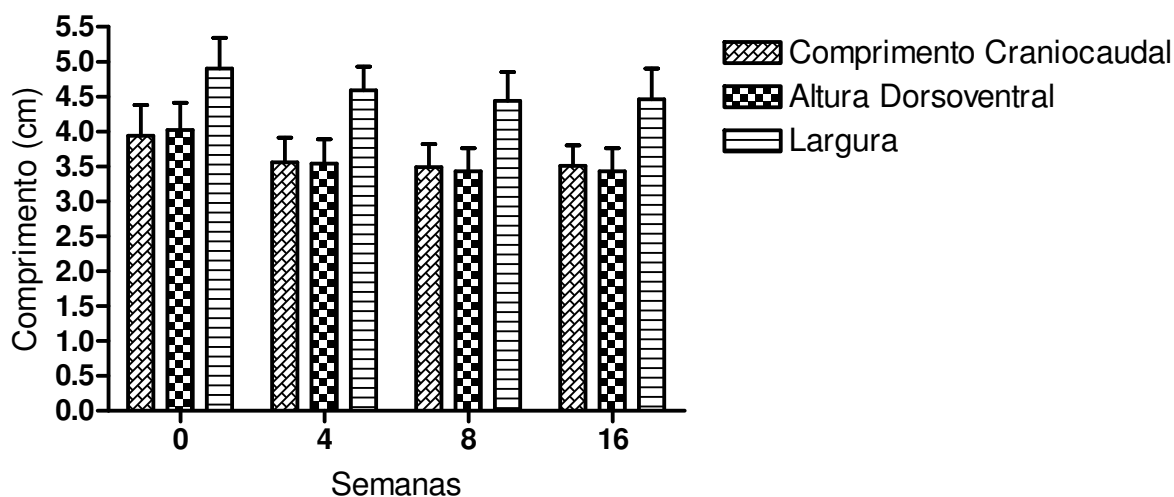


Figura 12. Representação gráfica das médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos (comprimento craniocaudal, altura dorsoventral e largura) de 6 cães que receberam a administração intra-prostática de 500 U de toxina botulínica do tipo A (Grupo III).

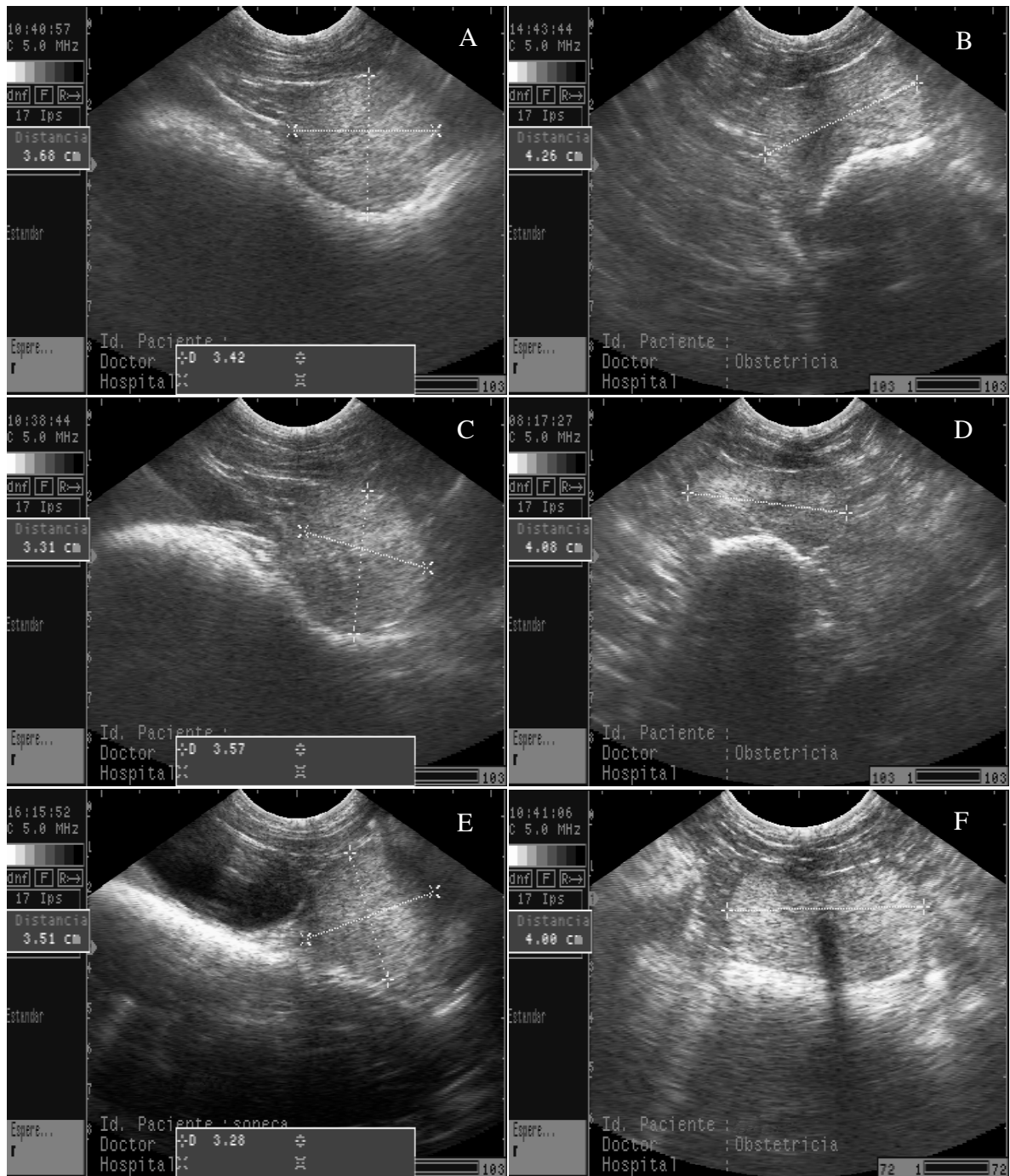


Figura 13. Imagem ultra-sonográfica longitudinal (A) e transversal (B) prostática de um cão antes do tratamento. Ultra-sonografia longitudinal (C) e transversal (D) da próstata após 8 semanas da administração de 500 U de toxina botulínica; notar a redução dos parâmetros. Imagem ultra-sonográfica longitudinal (E) e transversal (F) na 16ª semana após o início do tratamento; observar a estabilidade das variáveis.

5.2.3. Mensuração da Libido, Ereção e Variações Espermáticas

O período de adaptação dos cães e condicionamento às colheitas foi em média de três semanas. Os cães agressivos e ou que não se condicionaram a colheita de sêmen foram eliminados do estudo.

Nenhum dos animais pertencentes aos grupos II e III apresentaram quaisquer alterações visíveis de ereção e libido após a administração da toxina botulínica A.

Nenhuma diferença significativa foi observada nas variáveis espermáticas, incluindo volume, motilidade, vigor, concentração por mL, concentração total e pH, após a administração de toxina botulínica do tipo A nos animais pertencentes aos grupos II e III ao longo das 16 semanas de avaliação. As médias dos resultados dos ejaculados de 12 cães pertencentes aos grupos II e III estão apresentados nas tabelas 5 e 6.

Apesar da ocorrência de discretas alterações na morfologia espermática, a administração da toxina botulínica do tipo A não provocou alterações significativas nas porcentagens de espermatozóides normais, com defeitos maiores, com defeitos menores ou número total de defeitos. Os resultados da morfologia espermática dos grupos II e III estão listados nas tabelas 7 e 8, respectivamente. As médias e desvios padrão das morfologias espermáticas dos 12 animais estudados, antes e após a aplicação de 250 e 500 U de toxina botulínica, estão representados na Figura 14 e 15, respectivamente.

Tabela 5. Valores médios \pm desvio padrão das características espermáticas dos ejaculados de 6 cães submetidos a administração de 250 U de toxina botulínica A. Jaboticabal – SP, 2008.

Semana	Volume (mL)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração ($\times 10^6$ /mL)	Concentração Total ($\times 10^6$)	pH
0	3,25 \pm 0,94 ^A	88,3 \pm 3,7 ^A	3,90 \pm 0,25 ^A	54,17 \pm 8,64 ^A	177,17 \pm 63,46 ^A	6,32 \pm 0,08 ^A
2	3,33 \pm 1,13 ^A	87,7 \pm 2,3 ^A	3,88 \pm 0,13 ^A	49,33 \pm 8,38 ^A	161,42 \pm 57,23 ^A	6,27 \pm 0,06 ^A
4	3,17 \pm 0,93 ^A	88,3 \pm 2,0 ^A	4,02 \pm 0,26 ^A	49,17 \pm 8,59 ^A	157,17 \pm 60,39 ^A	6,28 \pm 0,06 ^A
8	3,00 \pm 0,89 ^A	88,7 \pm 2,3 ^A	3,97 \pm 0,15 ^A	52,33 \pm 9,67 ^A	157,92 \pm 60,68 ^A	6,26 \pm 0,05 ^A
16	3,17 \pm 0,93 ^A	89,5 \pm 2,3 ^A	4,00 \pm 0,0 ^A	52,00 \pm 11,92 ^A	158,92 \pm 45,08 ^A	6,28 \pm 0,08 ^A

A, B – Médias na mesma coluna com uma letra maiúscula em comum não diferem significativamente entre si pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

Tabela 6. Valores médios \pm desvio padrão das características espermáticas dos ejaculados de 6 cães submetidos a administração de 500 U de toxina botulínica A. Jaboticabal – SP, 2008.

Semana	Volume (mL)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração ($\times 10^6$ /mL)	Concentração Total ($\times 10^6$)	pH
0	4,33 \pm 2,27 ^A	87,7 \pm 4,7 ^A	3,97 \pm 0,08 ^A	49,50 \pm 24,98 ^A	190,00 \pm 86,69 ^A	6,45 \pm 0,23 ^A
2	3,73 \pm 1,11 ^A	86,2 \pm 3,9 ^A	3,90 \pm 0,11 ^A	53,17 \pm 16,58 ^A	194,68 \pm 76,43 ^A	6,33 \pm 0,21 ^A
4	3,50 \pm 1,55 ^A	88,7 \pm 3,5 ^A	4,03 \pm 0,26 ^A	61,50 \pm 44,46 ^A	178,58 \pm 56,34 ^A	6,33 \pm 0,21 ^A
8	3,88 \pm 1,13 ^A	88,2 \pm 3,9 ^A	4,03 \pm 0,28 ^A	47,17 \pm 5,56 ^A	181,18 \pm 47,95 ^A	6,30 \pm 0,14 ^A
16	3,25 \pm 1,67 ^A	89,0 \pm 3,1 ^A	4,13 \pm 0,25 ^A	57,33 \pm 17,10 ^A	169,17 \pm 52,30 ^A	6,32 \pm 0,09 ^A

A, B – Médias na mesma coluna com uma letra maiúscula em comum não diferem significativamente entre si pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

Tabela 7. Valores médios \pm desvio padrão das alterações morfológicas dos espermatozoides de 6 cães submetidos a administração de 250 U de toxina botulínica A. Jaboticabal – SP, 2008.

Normal (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Totais (%)
79,2 \pm 7,2 ^A	7,8 \pm 4,6 ^A	13,0 \pm 2,7 ^A	20,8 \pm 7,2 ^A
77,2 \pm 7,4 ^A	8,7 \pm 4,6 ^A	14,2 \pm 3,0 ^A	22,8 \pm 7,4 ^A
78,8 \pm 7,3 ^A	7,3 \pm 4,1 ^A	13,8 \pm 3,4 ^A	21,2 \pm 7,3 ^A
79,3 \pm 7,4 ^A	7,3 \pm 4,4 ^A	13,3 \pm 3,6 ^A	20,7 \pm 7,4 ^A
79,2 \pm 6,2 ^A	7,7 \pm 3,5 ^A	13,2 \pm 3,0 ^A	20,8 \pm 6,2 ^A

A, B – Médias na mesma coluna com uma letra maiúscula em comum não diferem significamente entre si pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

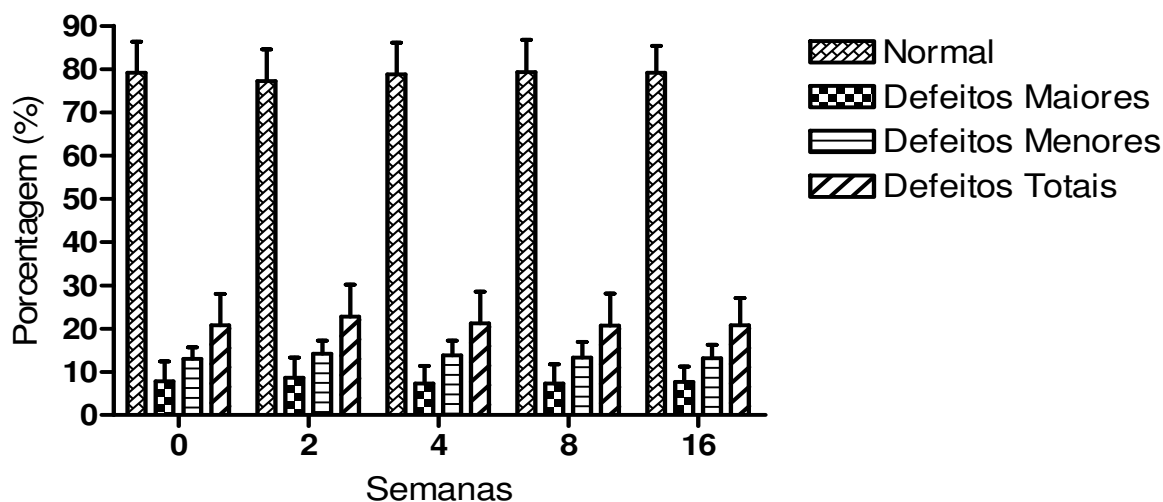


Figura 14. Representação gráfica das médias e desvios padrão das alterações morfológicas dos espermatozoides de 6 cães submetidos a administração intra-prostática de 250 U de toxina botulínica A (Grupo II).

Tabela 8. Valores médios \pm desvio padrão das alterações morfológicas dos espermatozoides de 6 cães submetidos a administração de 500 U de toxina botulínica A. Jaboticabal – SP, 2008.

Normal (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Totais (%)
70,8 \pm 11,6 ^A	11,5 \pm 8,1 ^A	17,7 \pm 5,4 ^A	29,2 \pm 11,6 ^A
68,2 \pm 11,3 ^A	13,0 \pm 9,6 ^A	18,8 \pm 4,2 ^A	31,8 \pm 11,3 ^A
70,2 \pm 13,0 ^A	11,3 \pm 9,8 ^A	18,5 \pm 4,5 ^A	29,8 \pm 13,0 ^A
70,8 \pm 10,8 ^A	11,3 \pm 9,2 ^A	17,8 \pm 4,1 ^A	29,2 \pm 10,8 ^A
72,0 \pm 12,2 ^A	10,7 \pm 7,3 ^A	17,3 \pm 5,9 ^A	28,0 \pm 12,2 ^A

A, B – Médias na mesma coluna com uma letra maiúscula em comum não diferem significativamente entre si pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

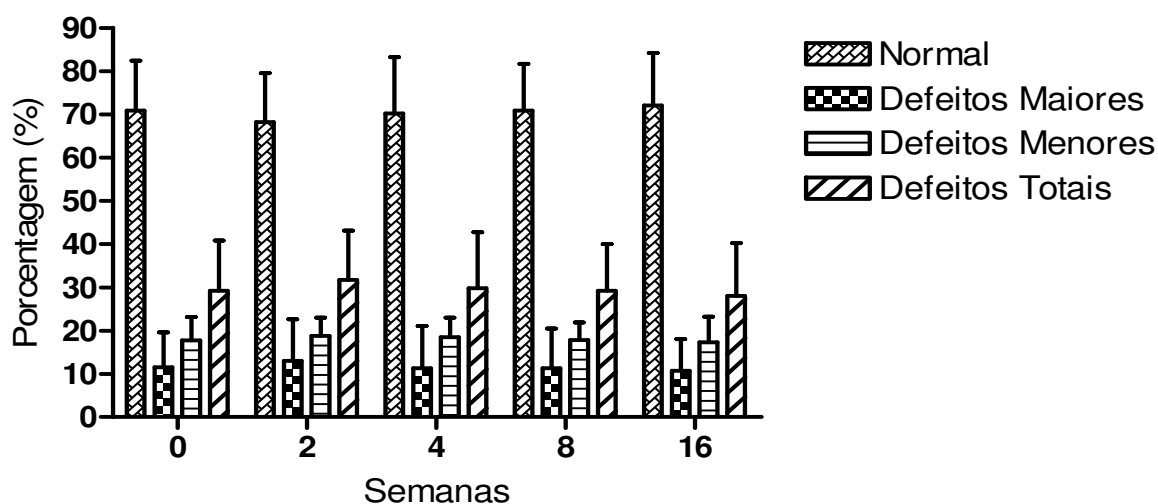


Figura 15. Representação gráfica das médias e desvios padrão das alterações morfológicas dos espermatozoides de 6 cães submetidos a administração intra-prostática de 500 U de toxina botulínica A (Grupo III).

5.2.3. Mensuração das Dosagens Hormonais

A concentração sérica média de testosterona e DHT antes da administração da toxina botulínica (tempo 0) não foi significamente desigual entre os GII e GIII, assim como entre os cães de cada grupo. Nenhuma diferença hormonal estatisticamente significativa foi observada após a aplicação de TB-A durante o período experimental.

Os resultados das concentrações séricas de testosterona e diidrotestosterona estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores médios \pm desvio padrão dos níveis séricos de testosterona e diidrotestosterona de 12 cães submetidos a administração de 250 (GII) ou 500 U (GIII) de toxina botulínica do tipo A, no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2008.

Grupo	Semanas	Testosterona (ng/mL)	Diidrotestosterona (pg/mL)
2	0	2,64 \pm 0,44 ^A	341,00 \pm 183,78 ^A
	4	2,72 \pm 0,31 ^A	360,78 \pm 220,10 ^A
	8	2,60 \pm 0,51 ^A	347,82 \pm 206,48 ^A
	16	2,70 \pm 0,41 ^A	352,88 \pm 198,18 ^A
3	0	2,93 \pm 0,35 ^A	348,41 \pm 113,12 ^A
	4	3,07 \pm 0,64 ^A	337,63 \pm 137,94 ^A
	8	3,00 \pm 0,13 ^A	310,42 \pm 87,10 ^A
	16	2,90 \pm 0,78 ^A	325,82 \pm 111,20 ^A

A, B – Médias na mesma coluna com uma letra maiúscula em comum não diferem significamente entre si pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

5.2.4. Variações Hematimétricas, Bioquímicas e Urinálise

Os resultados hematimétricos, bioquímicos (ALT e creatinina) e urinálise obtidos dos animais pertencentes aos grupos que receberam 250 e 500 U de toxina botulínica do tipo A no início, durante e ao final dos tratamentos permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie (KANEKO, 1997) e não apresentaram diferenças significativas.

6. DISCUSSÃO

Atualmente o atendimento de animais idosos corresponde a uma importante parcela da rotina dos hospitais e clínicas veterinárias, uma vez que melhorias nutricionais, farmacológicas e terapêuticas promoveram um aumento da expectativa de vida dos cães e, conseqüentemente, os problemas relacionados ao aparelho urogenital, com destaque para a próstata, se tornaram cada vez mais freqüentes. Dentre estes, a hiperplasia prostática benigna, uma condição comum, espontânea e relacionada com a idade é a mais comum.

Em vista do grande número de hipóteses sobre a patogênese desta condição, e das diferenças existentes entre a próstata humana e canina, o tratamento e manutenção da HPB está constantemente em transição. Embora a orquiectomia continue sendo o tratamento de escolha nos cães, esta nem sempre pode ser indicada a pacientes de alto risco ou naqueles destinados a programas de criopreservação de gametas e reprodução. Neste contexto, a experimentação de novos fármacos, como a toxina botulínica do tipo A, está assumindo importante papel neste cenário.

A interpretação dos resultados obtidos sobre os efeitos da TB-A, foi realizada com certa dificuldade, isto se devendo a pouquíssimas informações, quer na literatura veterinária, quer na relacionada à medicina humana, no entanto pretende, a seguir, sugerir e agregar alguns dados relacionados ao seu uso para o tratamento da hiperplasia prostática benigna.

Embora a maioria dos trabalhos relativos à HPB não destaque uma prevalência maior da afecção em determinadas raças, KRAWIEC & HEFLIN (1992) em seu estudo, destacaram uma ocorrência maior nos animais de raças puras, principalmente Pastor Alemão (15,38%) e Doberman Pinscher (1,92%). Diferentemente, no presente estudo os cães SRD constituíram a maior parte dos animais com HPB, conferindo 61% da amostra. Entretanto, 36,3% dos SRD possuíam características da raça Pastor Alemão e, portanto poderia também indicar um maior acometimento nestes. Os animais da amostra apresentaram entre três e 11 anos, com uma média de sete anos, aproximadamente a média de idade observada por DI SANTIS (2003).

Neste trabalho, a queixa principal dos proprietários, assim como a sintomatologia clínica observada durante o experimento foi hematúria, correspondendo esta a 55% das alterações, seguida por gotejamento de fluido uretral não associado à urina (23%) e dificuldade de defecação (15%). Os dados apresentados corroboram com os descritos por KRAWIEC & HEFLIN (1992), BAMBERG-THALÉN & LINDE-FORSBERG (1993), DORFMAN & BARSANTI (1995) e READ & BRYDEN (1995) que descreveram que a maior parte dos animais com HPB apresentam hematúria e ou sangramento espontâneo pelo pênis como os principais motivos do atendimento médico. Tais alterações podem ser devidas à presença de processo inflamatório e, conseqüentemente, ao aumento da vascularização prostática que a liberação de linfócitos e interleucinas promovem (LEE et al., 1997; JOHNSTON et al., 2001; KRAMER et al., 2007).

A HPB causa algumas alterações estruturais no órgão, sendo a principal delas, a prostatomegalia. Por esta razão, o aumento prostático é um indicativo importante desta afecção e pode ser determinado através dos exames ultra-sonográfico e radiológico. Em nosso estudo, a técnica radiográfica proposta por FEENEY et al. (1987a) e ATALAN et al. (1999), para determinação do tamanho prostático, facilitou e permitiu com eficiência a determinação da prostatomegalia, assim como permitiu a visibilização do contorno, da forma e da densidade radiográfica, sendo que os achados identificados nesta pesquisa corroboram com os dos referidos autores. Em relação à avaliação da uretra prostática, pela utilização da uretrocistografia retrógrada, esta se mostrou adequada e fácil, permitindo a avaliação e mensuração da uretra prostática e membranosa. A ultra-sonografia trans-abdominal permitiu identificar com clareza a textura da glândula prostática, entretanto, a identificação do bordo caudal do órgão foi dificultosa, principalmente quando este se apresentava na posição pélvica, onde a sínfise púbica foi uma barreira à penetração do som e também devido à presença de conteúdo fecal em cólon e reto. Os dados apresentados neste estudo para cães com hiperplasia estão de acordo com os relatados por FEENEY et al. (1987b) e HASEGAWA et al. (1996), pois os achados de aumento prostático simétrico, presença

de micro cistos intraparenquimais e parênquima de ecogenecidade mista também foram citados por eles.

As dosagens dos hormônios testiculares (testosterona e DHT) são importantes no estudo desta enfermidade, pois os andrógenos possuem um papel substancial na patogênese da HPB. Com relação aos resultados destas dosagens, não houve diferenças significativas entre os animais e os grupos na primeira avaliação e entre os cães dos GII e GIII durante todo o período experimental. SOUZA (1998) notou uma tendência a maiores valores de testosterona em animais idosos, verificando uma correlação positiva entre a concentração sérica deste hormônio e a idade. Entretanto, tal fato não foi observado neste estudo. De acordo com a literatura consultada, podem ser notadas divergências entre os autores. Segundo KLAUSNER et al. (1994) e BARSANTI & FINCO (1997) à medida que o cão envelhece, ocorre diminuição das concentrações hormonais, isto contradiz os resultados obtidos por LLOYD et al. (1975) quando não encontraram diferenças significativas entre os valores de testosterona plasmática e no tecido prostático. Da mesma forma que LOWSETH et al. (1990) encontramos uma grande variação nos níveis hormonais dentro de cada grupo, possivelmente isto se deve ao ritmo circadiano destes no cão, embora, as colheitas sangüíneas tenham sido feitas sempre no mesmo período.

A sazonalidade na produção de testosterona descrita por FALVO et al. (1980) e MARTINS (2005), os quais relatam aumentos da concentração sérica deste hormônio nos períodos mais frescos, como primavera e outono, e diminuição durante os meses mais quentes não pode ser observada e correlacionada, uma vez que pacientes pertencentes ao mesmo grupo não foram avaliados nas mesmas ocasiões. Outras dificuldades em estudar o perfil hormonal seriam: a variação individual, a obtenção de um grande número de cães da mesma raça e submetidos ao mesmo manejo. Embora neste estudo, as colheitas tenham sido realizadas num mesmo horário, as demais variáveis não puderam ter os seus efeitos diminuídos.

Segundo PENNEFATHER et al. (2000) a atividade neuronal está envolvida no crescimento prostático, assim como em suas funções. A desregulação desta atividade poderia alterar a morfologia e o comportamento da próstata. Estes eventos patológicos

são causados por uma mudança significativa nos neurotransmissores (acetilcolina) e fatores de crescimento, podendo desta maneira resultar no desenvolvimento do parênquima da glândula, originando a HPB. Portanto, a normalização ou uma correção favorável desta alteração neuronal seria capaz de reverter significativamente o processo patológico e melhorar os sintomas relacionados à HPB. Destarte, a toxina botulínica do tipo A seria uma opção atrativa para o tratamento da HPB, uma vez que ela promoveria esta regulação, causando uma inibição da liberação de acetilcolina junto à terminação nervosa pré-sináptica, diminuindo a proliferação celular (CHUANG et al., 2005). Por esta razão, escolhemos a TB-A no intuito de compará-la à técnica de orquiectomia, tradicionalmente empregada no tratamento desta enfermidade.

O método de administração da toxina botulínica A mostrou-se de baixa complexidade. A progressão da agulha no parênquima prostático e os locais de injeção foram facilmente controlados pela ultra-sonografia trans-abdominal. Os resultados obtidos com a aplicação da TB-A em somente um local por lobo foram semelhantes aos encontrados por LIN et al. (2007), o qual realizou o procedimento de injeção em dois pontos. AOKI (2001b) descreve que após a solução de neurotoxina ser infundida, a dispersão do produto a partir do sítio de introdução da agulha alcança em média 3 cm. Portanto, consideramos que a metodologia empregada facilita o procedimento, assim como regride o tempo em que o paciente permanecerá anestesiado, diminuindo-se os riscos.

No presente trabalho foi notado que após o tratamento com TB-A os cães apresentavam ao toque retal próstatas mais macias quando confrontadas com a primeira avaliação. DI SANTIS (2003) relatou que a maioria dos animais entre seis e 8,5 anos apresentam, em relação ao tipo histológico de hiperplasia, características de aumento dos compartimentos estromal e glandular. Deste modo, apesar da não realização de exames histopatológicos, acreditamos que nossos animais se enquadram neste tipo de proliferação celular e que a maior suavidade e maciez do tecido prostático verificada ao toque após o uso da toxina pode estar relacionada à regressão do colágeno, do estroma fibroso e também da atrofia glandular que o fármaco produziu, alcançando este parênquima características próximas as próstatas de animais jovens.

Em nosso estudo, todos os cães orquiectomizados e os que receberam a administração de toxina botulínica apresentaram diminuição do volume prostático, assim como decréscimo das lesões cavitárias (microcistos) e aumento da homogeneidade do parênquima glandular. Nos animais onde a aplicação de toxina foi maior (GIII), observou-se uma queda significativa na média do volume quando comparado aos valores basais. Ao final do período experimental esta redução representou aproximadamente 30%. Curiosamente, dois terços deste decréscimo já pode ser observado na quarta semana, indicando o rápido efeito do fármaco. A diminuição no volume da próstata esteve associada com o cessar dos sinais clínicos. Nos estudos realizados por KUO (2003 e 2004) observou-se que os efeitos terapêuticos da toxina botulínica, assim como a melhora dos sintomas apresentados pelos pacientes que sofriam de dissinergia do detrusor do esfíncter foram notados entre o sétimo e décimo quarto dia. SANDERS et al. (1986) avaliando os efeitos da TB-A sobre o blefaroespasma relataram melhora dos sinais entre cinco e 10 dias. Neste estudo, dados semelhantes também foram obtidos, sendo que o desaparecimento dos sinais clínicos observados pelos proprietários ocorreu em média após 10 dias do início do tratamento.

BARSANTI & FINCO (1995) avaliando a resposta da orquiectomia em animais com hiperplasia prostática, descreveram que após uma semana da realização da castração iniciou-se a involução da próstata e diminuição dos sinais clínicos. Depois de três semanas o volume da glândula havia regredido 50%, atingindo um decréscimo de 75% posteriormente a nove semanas. Em outro estudo, oito cães apresentaram resolução completa dos sinais clínicos dentro de um período de quatro semanas (READ & BRYDEN, 1995). Os dados encontrados em nosso experimento estão de acordo com os descritos pelos autores acima, pois os sinais expostos pelos proprietários cessaram depois de uma semana da prática do procedimento. Após 16 semanas da orquiectomia, obtivemos uma redução dos parâmetros volume, comprimento, altura e largura da próstata de 80,5, 51,8, 41,6 e 48,3%, respectivamente. Como a próstata é um órgão andrógeno-dependente e ambos os compartimentos (estromal e glandular) são sensíveis a este, a resolução e decréscimo das variáveis ocorrem em função da queda

que a orquiectomia promove nos níveis hormonais de testosterona (de $2,90 \pm 0,73$ para $< 0,1$ ng/mL) e diidrotestosterona (de $706,18 \pm 339,33$ para $189,09 \pm 112,68$ pg/mL). A pequena produção de testosterona pela glândula adrenal é incapaz de suprir esta queda e manter a normalidade no órgão (JOHNSTON et al., 2001). Concordando também com esta afirmativa, LIN et al. (1995) citaram que posteriormente a orquiectomia ocorreu evidente atrofia prostática seguida por diminuição da concentração sangüínea de testosterona. Por outro lado, a administração de toxina botulínica A não acarretou alterações significativas nos níveis hormonais de testosterona e DHT nos animais pertencentes aos grupos II e III, possuindo, portanto uma ação indireta sobre a próstata.

Afim ainda de verificar os efeitos que a orquiectomia provoca sobre a próstata, NIU et al. (2001 e 2003) e SHIDAIFAT et al. (2007), afirmaram que além da redução do volume do órgão ocorrer em virtude da diminuição dos níveis de testosterona e DHT, após sete dias da cirurgia ocorre uma diminuição gradual na expressão de receptores androgênicos, alcançando aos 90 dias números insignificantes. Outras ressalvas citadas foram que entre o segundo e décimo quarto dia acontecem mudanças morfológicas e apoptose das células musculares lisas, das epiteliais glandulares e dos fibroblastos estromais, seguida após este tempo de um aumento gradual do TGF- β (potente inibidor do epitélio prostático), enquanto a expressão do KGF (importante fator de crescimento) diminui. Desta maneira, toda a morfologia e fisiologia do tecido da glândula se alteram, respondendo negativamente a ausência da testosterona e DHT.

A injeção de toxina botulínica não provocou o surgimento de qualquer sinal ou sintoma de botulismo, apesar da extensa irrigação sangüínea presente na próstata, a qual em teoria poderia facilitar a difusão sistêmica da neurotoxina. A segurança da toxina também pode ser observada pela ausência de alterações que sua aplicação proporcionou nos padrões hematológicos, bioquímicos e na urinálise. Tal fato e descrição corroboram com os encontrados por MARIA et al. (2003) e CHUANG et al. (2005), que sugerem que a TB-A é extremamente segura quando utilizada para o tratamento da HPB. Acreditamos que o surgimento de hematúria ocasional em dois animais após as primeiras 24 horas da ministração do fármaco, seja devido a pequenas

lesões que a introdução da agulha causa no parênquima prostático e que estas são minimizadas com a experiência do operador, uma vez que estes cães foram os primeiros a receberem a toxina botulínica. CHUANG et al. (2005) também citaram o surgimento da presença de sangue na urina e disúria em três pacientes, entretanto, estes não apresentaram nenhuma explicação para tal achado.

Apesar do pequeno número de animais estudados e do fato de que o tamanho prostático avaliado pela ultra-sonografia trans-abdominal ser influenciado pelo operador (ultra-sonografista), a redução do volume da glândula confirma as observações prévias descritas por outros pesquisadores (DOGGWEILER et al., 1998; MARIA et al. 2003; KUO, 2003; CHUANG et al., 2005 e 2006a,b; LIN et al., 2007). O decréscimo observado neste experimento não foi o mesmo atingindo por MARIA et al. (2003) ou CHUANG et al. (2006b), os quais conseguiram uma diminuição superior a 50% em homens e ratos, respectivamente. Entretanto, os dados aqui apresentados para os animais que receberam a administração de 250 U de toxina botulínica estão de acordo com os encontrados por CHUANG et al. (2006a), que injetando 100 U de neurotoxina em oito cães não obtiveram redução significativa do volume da próstata, conseguindo somente uma depleção de 8,2% após três meses da aplicação. Em nosso estudo, a maior regressão do volume ocorreu no segundo mês, atingindo esta 9,4%. Uma explicação para esta variedade de resultados seria a utilização de diferentes doses de toxina botulínica e a desigualdade entre as proporções dos compartimentos prostáticos (glandular e estromal) nas diferentes espécies. Outra possível elucidação seria o fato de que diferentes indivíduos da mesma espécie apresentam disparidades individuais quanto à capacidade de regeneração neurológica (SANDERS et al., 1986); esta teoria poderia em parte explicar a ampla variedade de reduções obtidas sobre o volume (20 a 50%) com a aplicação da mesma dose de toxina por inúmeros pesquisadores.

LIN et al. (2007) relataram que após um mês da aplicação de 200 U de TB-A na próstata de cães ocorreu uma diminuição significativa de 24% no tamanho do órgão. No presente estudo, a avaliação da resposta à administração de 500 U de toxina botulínica após quatro semanas mostrou decréscimo muito semelhante ao relatado por LIN et al. (2007). Neste período observamos que o volume prostático regrediu em 24,3%. Por

outro lado, notamos uma maior depleção após oito e 16 semanas, atingindo estes valores de 29,8 e 29,3%, respectivamente. Tais dados ainda sugerem que a relação de equivalência entre as concentrações de BOTOX® e DYSPORT® proposta por ROSALES et al. (2006) e utilizada neste experimento foi extremamente confiável, uma vez que experimentos realizados com diferentes marcas de toxina botulínica apresentaram resultados semelhantes.

A grande variação obtida entre as reduções promovidas por diferentes doses de neurotoxina, sugere ser prematuro indicar a dose ideal para o tratamento da HPB canina, uma vez que doses entre 250 e 500 U, assim como quantidades maiores ainda não foram testadas. CHUANG et al. (2006b) avaliando diferentes bolus de toxina em próstatas de ratos relataram a ocorrência de um decréscimo do volume dose-dependente. Estes resultados são semelhantes aos obtidos neste trabalho, onde os efeitos da TB-A sobre as variáveis comprimento craniocaudal, altura dorsoventral, largura transversa e volume prostático foram maiores com a administração de 500 U.

A observação de pontos de necrose nos locais de aplicação da toxina botulínica pela ultra-sonografia poderia explicar a rápida redução do volume, entretanto, às avaliações ultra-sonográficas desta pesquisa não evidenciaram tal alteração. Esta visualização confirma os dados encontrados na literatura no que concerne a ausência de necrose nas áreas de injeção da TB-A (MARIA et al., 2003, CHUANG et al., 2005; KUO, 2005; CHUANG et al., 2006a). Segundo alguns autores (DOGGWEILER et al., 1998; CHUANG et al., 2005 e 2006a,b; LIN et al. 2007), conduzindo estudos em ratos, humanos e cães, respectivamente, a razão pela qual a terapia com neurotoxina promove decréscimo do tamanho da próstata seria a ocorrência de morte celular programada, a qual estaria relacionada a uma ação indireta da toxina (denervação) sobre a próstata.

Três diferentes tipos de fibras cursam no tecido prostático: as aferentes primárias e as fibras simpáticas e parassimpáticas. A inervação parassimpática está localizada preferencialmente no compartimento glandular da próstata, onde a aplicação de toxina botulínica causa uma significativa apoptose (DOGGWEILER et al., 1998; CHUANG et al., 2006b). A acetilcolina liberada por estas fibras regula a secreção do órgão após

atingir seus sítios de ligação (receptores muscarínicos) (RUGGIERI et al., 1995; WITTE et al., 2007). Nos cães, o crescimento prostático envolve principalmente os compartimentos glandulares, produzindo obstrução retal e constipação. No entanto, observações clínicas são decorrentes do aumento no peso prostático de cães idosos atribuído à proliferação de ambos os compartimentos, tanto o glandular como o estromal (LOWSETH et al., 1990; COHEN et al., 1995; LAROQUE et al., 1995). Por conseguinte, é provável que parte da redução observada após a administração da toxina botulínica seja devido a um decréscimo da secreção mediada pela acetilcolina e diminuição no número de células glandulares.

Por outro lado, tem se mostrado que a injeção de TB-A provoca uma queda da liberação de norepinefrina oriunda dos nervos adrenérgicos do parênquima estromal, causando marcante apoptose. Em adição, pode ocorrer uma depleção na produção de fatores de crescimento epidermal, os quais possuem atividade tróficas, em virtude desta denervação (MACKENZIE et al., 1982; MARINESE et al., 2003). Desta maneira, é admissível que uma parte dos resultados obtidos com a toxina botulínica seja conseqüência da intoxicação das fibras simpáticas e queda da atividade adrenérgica.

Os resultados obtidos no presente estudo estão em concordância com os relatados por MARIA et al. (2003) e SILVA et al. (2008) quanto à ocorrência de máxima depleção do volume prostático após dois ou três meses da injeção de TB-A. Da mesma maneira, os dados aqui descritos (aumento do volume prostático após 16 semanas quando comparado com os da oitava semana) estão de acordo com os encontrados na literatura (SANDERS et al., 1986; GUERRISSI, 2000), no que se refere ao período de efetividade da toxina do tipo A, onde estes apresentam declínio após quatro a seis meses. Todavia, é incerto por quanto tempo a redução do volume prostático permanecerá em níveis aceitáveis, assim como a ausência de sinais clínicos, sendo necessários novos estudos para se avaliar estas incógnitas.

No que diz respeito à comparação entre os tratamentos realizados neste experimento, a orquiectomia evidenciou resultados muito superiores aos dos cães que receberam a aplicação de toxina botulínica. Tal discrepância está relacionada ao fato de que com a retirada dos testículos, as concentrações séricas de testosterona e DHT

atingem níveis mínimos na circulação. KLAUSNER et al. (1994) e STEERS (2001) relatam que o DHT, um andrógeno originado a partir da testosterona, possui maior afinidade por receptores androgênicos, atuando assim como o principal hormônio responsável pela proliferação celular que ocorre na próstata de animais com HPB. Portanto, com a redução hormonal ocasionada pela orquiectomia os sinais clínicos e aumentos prostáticos regridem enormemente. Por outro lado, CHUANG et al. (2006b) descreve que a toxina botulínica do tipo A não afeta a expressão dos receptores de andrógenos no tecido prostático, permanecendo intacta a capacidade de resposta à influência trófica da testosterona e de seus metabólitos (DHT). Esta habilidade poderia, portanto, causar uma menor diminuição das variáveis comprimento, altura, largura e volume da glândula e também explicar em parte a menor duração dos efeitos sobre o órgão. Futuras investigações promovendo a associação da TB-A com outros fármacos, por exemplo, os inibidores da enzima 5 α -redutase, seriam interessantes para avaliar se melhores resultados seriam alcançados e também verificar o atraso que esta combinação poderia causar no novo crescimento prostático após a suspensão dos efeitos da toxina.

De acordo com alguns autores (MÜLLER et al., 1988; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 1997; TSUITSUI et al., 2001; CORRADA et al., 2004), a diminuição da libido e alterações de ereção ocorrem em virtude da orquiectomia, ou da aplicação de fármacos ou problemas que acarretam queda dos níveis séricos de testosterona. No presente estudo, tais efeitos sobre a libido e ereção não foram observados, em virtude dos níveis hormonais permanecerem dentro da normalidade para a espécie antes e posteriormente ao tratamento com TB-A (passando de $2,26 \pm 0,34$ para $2,23 \pm 0,23$ ng/mL nos cães do grupo II, e de $2,93 \pm 0,35$ para $2,90 \pm 0,78$ ng/mL nos animais do grupo III). Corroborando com nossos dados, LIM & QUEK (2008) não mencionaram nenhuma disfunção ejaculatória após a aplicação intraprostática e no colo da bexiga de neurotoxina em pacientes que possuíam dissinergia vesical.

Neste estudo, não foram observadas alterações significativas nas características (volume, motilidade, vigor, concentração por mL, concentração total e pH) e morfologia espermática posteriormente a administração de 250 ou 500 U de toxina botulínica.

Estes resultados concordam com os apresentados por SPOSITO (2004), que avaliando a influência da neurotoxina sobre a fertilidade de ratos descreveu que esta somente ocasionou ligeiro decréscimo desta quando elevadas doses foram fornecidas a estes animais. Segundo o mesmo autor, altas concentrações ministradas a fêmeas provocaram alterações no ciclo estrogênico, entretanto, esta desregulação não originou mudanças no número e na viabilidade dos embriões. Em função do tratamento com toxina botulínica ser apresentado como uma alternativa a orquiectomia em cães reprodutores que apresentam hiperplasia, estudos mais profundos avaliando a prenhez de fêmeas cruzadas com estes animais, viabilidade dos embriões e filhotes no pós-parto seriam de fundamental importância.

Os resultados seminiais do presente estudo mostraram ainda que a morfologia espermática encontrasse abaixo dos valores de normalidade para a espécie. Segundo JOHNSTON et al. (2001) e FELDMAN & NELSON (2004) se aceita como padrão normal de morfologia índices superiores a 80%. Isso pode estar relacionado à idade dos animais, uma vez que cães com idade superior a sete anos apresentaram espermatozoides com maior número de defeitos (maiores, menores e totais) quando comparados com os mais novos. Aspectos nutricionais também podem estar envolvidos nesta queda, pois a alimentação fornecida pelos proprietários era constituída por ração de baixa qualidade (econômica). Todavia, estudos avaliando estas hipóteses e relacionando todas as variáveis envolvidas neste processo, far-se-ão necessários. Ademais, pesquisas na espécie canina são fundamentais para investigar melhor a correlação dos efeitos da toxina botulínica do tipo A com o parênquima prostático, utilizando um maior número de animais, assim com sua dose ideal, longevidade de ação e implicações sobre a fertilidade *in vitro* e *in vivo*. Com esses resultados a mão, sua aplicação prática será útil, tanto nos cães domésticos, como nos seres humanos.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo e nas condições do experimento, concluiu-se que:

- ✓ A redução ou desaparecimento da sintomatologia clínica presente em cães com HPB ocorre em média após uma semana da orquiectomia e posteriormente a duas semanas da utilização da toxina botulínica A.
- ✓ A orquiectomia apresenta resultados superiores quando comparado com a administração de TB-A para o tratamento da HPB.
- ✓ A regressão do volume prostático após 16 semanas da orquiectomia atinge níveis 80% menores aos do início do procedimento.
- ✓ As reduções dos parâmetros da próstata após a orquiectomia ocorrem em função da diminuição das concentrações séricas de testosterona e diidrotestosterona.
- ✓ O método de aplicação da neurotoxina é seguro e de baixa complexidade, não apresentando nenhuma complicação local ou sistêmica.
- ✓ A injeção de 250 U de TB-A não apresenta resultados significativos sobre a próstata de animais com hiperplasia.
- ✓ A administração de 500 U de toxina ocasionou reduções significativas no parênquima prostático, sendo esta dose a preconizada para o início da terapia da HPB.
- ✓ A aplicação de toxina nas doses utilizadas neste experimento não acarretam mudanças significativas nas concentrações séricas de testosterona e DHT, na libido, na ereção e também nas características (volume, vigor, motilidade, concentração por mL, concentração total e pH) e morfologia espermática.

8. REFERÊNCIAS¹

ANTUNES, A. A.; et al. Botulinum toxin for the treatment of lower urinary tract symptoms due to benign prostatic hyperplasia. **Nature Clinical Practice Urology**, v. 4, n. 3, p. 155-160, 2007.

AOKI, K. R. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. **Toxicon**, v. 39, n. 12, p. 1815-1820, 2001a.

AOKI, K. R. Pharmacology and immunology of botulinum toxin serotypes. **Journal of Neurology**, v. 248, suppl. 1, p. 3-10, 2001b.

ATALAN, G.; BARR, F. J.; HOLT, P. E. Comparison of Ultrasonographic and radiographic measurements of canine prostate dimensions. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 40, n. 4, p. 408-412, 1999.

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

BARSANTI, J. A. Prostatic hyperplasia: medical therapy. **Proceedings American Clinical Veterinary Internal Medicine**, v. 17, p. 536-538, 1999.

BARSANTI, J. A.; FINCO, D. R. Medical management of canine prostatic hyperplasia. In: BONAGURA, J. D.; KIRK, R. W. (Ed.) **Current Veterinary Therapy XII**. Philadelphia: Saunders, 1995. p. 1033-1034.

¹ABNT-NR 6023

BARSANTI, J. A.; FINCO, D. R. Moléstias Prostáticas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.) **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. p. 2294-2325.

BARTSCH, G.; et al. Correlation of biochemical (receptors, endogenous, tissue hormones) and quantitative morphologic (stereologic) findings in normal hyperplastic human prostates. **Journal of Urology**, v. 137, n. 3, p. 559-564, 1987.

BASINGER, R. R.; ROBINETTE, C. L.; HARDLE, E. M.; SPAULDING, K. A. Próstata. In: SLATTER, D. (Ed.) **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1998. p. 1607-1628.

BENEDETTO, A. V. The cosmetic use of botulinum toxin type A. **International Journal of Dermatology**, v. 38, n. 9, p. 641-655, 1999.

BERRY, S. J. et al. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. **The Journal of Urology**, v. 132, n. 3, p. 474-479, 1984.

BERRY, S. J. et al. Effect of aging on prostate growth in beagles. **The American Journal of Physiology**, v. 19, p. 1039-1046, 1986.

BLOCH, W. et al. Distribution of nitric oxide synthase implies a regulation of circulation, smooth muscle tone, and secretory function in the human prostate by nitric oxide. **Prostate**, v. 33, n. 1, p. 1-8, 1997.

BÖNI, R.; KREIDEN, O. P.; BURG, G. Revival of the use of botulinum toxin: application in dermatology. **Dermatology**, v. 200, n. 4, p. 287-291, 2000.

BORODIC, G. et al. Botulinum toxin therapy, immunologic resistance, and problems with available materials. **Neurology**, v. 46, n. 1, p. 26-29, 1996.

BRENDLER, C. B. et al. Spontaneous benign prostatic hyperplasia in beagle. Age-associated changes in serum hormone levels, and the morphology and secretory function of the canine prostate. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 71, n. 5, p. 1114-1123, 1983.

BURGEN, A. S. V.; DICKENS, F.; ZATMAN, L. J. The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction. **The Journal of Physiology**, v. 109, n. 12, p. 10-24, 1949.

CARLIN, J. R. et al. Disposition and metabolism of finasteride in dogs. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 25, n. 1, p. 100-109, 1997.

CARSON III, C.; RITTMASER, R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. **Urology**, v. 61, suppl. 4a, p. 2-7, 2003.

CHUANG, Y. C. et al. Botulinum toxin type A improves benign prostatic hyperplasia symptoms in patients with small prostates. **Urology**, v. 66, n. 4, p. 775-779, 2005.

CHUANG, Y. C. et al. Intraprostatic injection of botulinum toxin type-A relieves bladder outlet obstruction in human and induces prostate apoptosis in dogs. **BMC Urology**, v. 6, n. 12, 2006a.

CHUANG, Y. C. et al. Novel action of botulinum toxin on the stromal and epithelial components of the prostate gland. **Journal of Urology**, v. 173, n. 3, p. 1158-1163, 2006b.

CHUANG, Y. C. et al. Sustained beneficial effects of intraprostatic botulinum toxin type A on lower urinary tract symptoms and quality of life in men with benign prostatic hyperplasia. **BJU International**, v. 98, n. 5, p. 1033-1037, 2006c.

COCHRAN, R. C.; EWING, L. L.; NISWENDER, G. D. Serum levels of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin, testosterone, 5 α -dihydrotestosterone, 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol, 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol, and 17 β -estradiol from male beagles with spontaneous or induced benign prostatic hyperplasia. **Investigative Urology**, v. 19, n. 3, p. 142-147, 1981.

COCKETT, A. T. et al. Relationship of neuroendocrine cells of prostate and serotonin to benign prostatic hyperplasia. **Urology**, v. 42, n. 5, p. 512-519, 1993.

COHEN, S. M. et al. Comparison of the effects of new specific azasteroid inhibitors of steroid 5 α -reductase on canine hyperplastic prostate: suppression of prostatic DHT correlated with prostate regression. **The Prostate**, v. 26, n. 2, p. 55-71, 1995.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.

CORRADA, Y. et al. Effect of tamoxifen citrate on reproductive parameters of male dogs. **Theriogenology**, v. 61, n. 7-8, p. 1327-1341, 2004.

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

COURT, E. A. et al. Effects of delmadinone acetate on pituitary-adrenal function, glucose tolerance and growth hormone in male dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 76, n. 8, p. 555-560, 1998.

DAVLETOV, B.; BAJOHRS, M.; BINZ, T. Beyond BOTOX: advantages and limitations of individual botulinum neurotoxins. **TRENDS in Neurosciences**, v. 28, n. 8, p. 446-452, 2005.

DE KLERK, D. P. et al. Comparison of spontaneous and experimentally induced canine prostatic hyperplasia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 64, n. 3, p. 842-849, 1979.

DE PAIVA, A. et al. Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 6, p. 3200-3205, 1999.

DI SANTIS, G. W. **Estudo morfológico, morfométrico e imunohistoquímico de próstatas caninas normais e hiperplásicas**. 2003. 124f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2003.

DOGGWEILER, R. et al. Botox-induced prostatic involution. **The Prostate**, v. 37, n. 1, p. 44-55, 1998.

DOLLY, J. O. Therapeutic and research exploitation botulinum neurotoxins. **European Journal of Neurology**, v. 4, suppl. 2, p. s5-s10, 1997.

DOLLY, J. O. Synaptic transmission: inhibition of neurotransmitter release by botulinum toxins. **Headache**, v. 43, suppl. 1, p. s16-s24, 2003.

DORFMAN, M.; BARSANTI, J. A. Diseases of the canine prostatic gland. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 17, p. 791-811, 1995.

DRESSLER, D.; SABERI, F. A.; BARBOSA, E. R. Botulinum toxin: mechanisms of action. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 63, n. 1, p. 180-185, 2005.

EWING, L. L.; BERRY, S. J.; HIGGINBOTTON, E. G. Dihydrotestosterone concentration of beagle prostatic tissue: effect of age and hyperplasia. **Endocrinology**, v. 113, n. 6, p. 2004-2009, 1983.

FALLER, B.; FARLEY, D.; NICK, H. Finasteride: a slow-binding 5 α -reductase inhibitor. **Biochemistry**, v. 32, n. 21, p. 5705-5710, 1993.

FALVO, R. E. et al. Annual variations in plasma levels of testosterone and luteinizing hormone in the laboratory male mongrel dog. **Journal of Endocrinology**, v. 86, n. 3. p. 425-430, 1980.

FEENEY, D. A. et al. Canine prostatic disease – comparison of radiographic appearance with morphologic and microbiologic findings: 30 cases (1981-1985). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 190, n. 8, p. 1018-1026, 1987a.

FEENEY, D. A. et al. Canine prostatic disease – comparison of ultrasonographic appearance with morphologic and microbiologic findings: 30 cases (1981-1985). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 190, n. 8, p. 1027-1034, 1987b.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Clinical and diagnostic evaluation of the male reproduction tract. In: FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. (Ed.) **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2004. p. 930-952.

FULTON, J. E. Botulinum toxin. The Newport Beach experience. **Dermatologic Surgery**, v. 24, n. 11, p. 1219-1224, 1998.

GARCIA, A.; FULTON, J. E. Cosmetic denervation of the muscles of facial expression with botulinum toxin . A dose response study. **Dermatologic Surgery**, v. 22, p. 38-43, 1996.

GÖSCHEL, H. et al. Botulinum A toxin therapy: neutralizing and nonneutralizing antibodies - therapeutic consequences. **Experimental Neurology**, v. 147, n. 1, p. 96-102, 1997.

GUERCINI, F. et al. Intraprostatic botulinum toxin injection in patients with severe benign prostatic hyperplasia: a multicenter feasibility study. **Journal of Urology**, v. 173, suppl. 1, p. 376, 2005.

GUERRISSI, J. O. Intraoperative injection of botulinum toxin A into orbicularis oculi muscle for the treatment of crow's feet. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 105, n. 6, p. 2219-2225, 2000.

HARPER, M.; FOWLER, C. J.; DASGUPTA, P. Botulinum toxin and its application in the lower urinary tract. **BJU International**, v. 93, n. 6, p. 702-706, 2004.

HASEGAWA, Y.; SAKAMOTO, N.; GOTOH, K. Relationship of ultrasonic and histologic findings in benign prostatic hyperplasia. **The Prostate**, v. 28, n. 2, p. 111-116, 1996.

HEDLUND, H.; ANDERSSON, K. E.; LARSSON, B. Alpha-adrenoceptors and muscarinic receptors in the isolated human prostate. **Journal of Urology**, v. 134, n. 6, p. 1291-1298, 1985.

HIGGINS, J. R.; GOSLING, J. A. Studies on the structure and intrinsic innervation of the normal human prostate. **The Prostate**, suppl. 2, p. 5-16, 1989.

HUANG, W.; FOSTER, J. A.; ROGACHEFSKY, A. S. Pharmacology of botulinum toxin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, p. 249-259, 2000a.

HUANG, W.; ROGACHEFSKY, A. S.; FOSTER, J. A. Browlift with botulinum toxin. **Dermatologic Surgery**, v. 26, n. 1, p. 55-60, 2000b.

HUGHES, R.; WHALER, B. C. Influence of nerve-ending activity and of drugs on the rate of paralysis of rat diaphragm preparations by Cl. botulinum type A toxin. **The Journal of Physiology**, v. 160, p. 221-233, 1962.

HUMEAU, Y. et al. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. **Biochimie.**, v. 82, n. 5, p. 427-446, 2000.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. P. Effect of finasteride (Proscar MSD) on seminal composition, prostate function and fertility in male dogs. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 51, p. 139-149, 1997.

ISAACS, J. T.; COFFEY, D. S. Changes in dihydrotestosterone metabolism associated with the development of canine benign prostatic hyperplasia. **Endocrinology**, v. 108, n. 2, p. 445-453, 1981.

JANULIS, L.; LEE, C. Prostate gland. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, 1999, v. 4, p. 77-85.

JOHNSTON, S. D. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, n. 3, p. 545-551, 1991.

JOHNSTON, S. D. et al. Prostatic disorders in the dog. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, n. 1-3, p. 405-415, 2000.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. Disorders of the canine prostate. In: JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. (Ed.) **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. p. 337-355.

JUNIEWICZ, P. E. et al. The requirement of the testis in establishing the sensitivity of the canine prostate to develop benign prostatic hyperplasia. **Journal of Urology**, v. 152, n. 3, p. 996-1001, 1994.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932p.

KARSENTY, G. et al. Toxines botuliques: applications urologiques. **Progrès en Urologie**, v. 16, n. 3, p. 263-274, 2006.

KAWAKAMI, E. et al. Effects of oral administration of chlormadinone acetate on canine prostatic hypertrophy. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 4, p. 631-635, 1993.

KAWAKAMI, E. et al. Comparison of the effects of chlormadinone acetate-pellet implantation and orchidectomy on benign prostatic hypertrophy in the dog. **International Journal of Andrology**, v. 18, n. 5, p. 248-255, 1995.

KLAUSNER, J. S. et al. Recent developments in the diagnosis and treatment of HPB and prostatic carcinoma. In: AMERICAN COLLEGE VETERINARY MEDICINE CONGRESS, 1994, Pomona. **Proceedings....**, p. 547-548.

KRAMER, G.; MITTEREGGER, D.; MARBERGER, M. Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease? **European Urology**, v. 51, n. 5, p. 1202-1216, 2007.

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

KUMAR, V. L.; MAJUMDER, P. K. Prostate gland: structure, functions and regulation. **International Urology and Nephrology**, v. 27, n. 3, p. 231-243, 1995.

KUO, H. C. Effect of botulinum A toxin in the treatment of voiding dysfunction due to detrusor underactivity. **Urology**, v. 61, n. 3, p. 550-554, 2003.

KUO, H. C. Urodynamic evidence of effectiveness of botulinum A toxin injection in the treatment of detrusor overactivity refractory to anticholinergic agents. **Urology**, v. 63, n. 5, p. 868-872, 2004.

KUO, H. C. Prostate botulinum A toxin injection – an alternative treatment for benign prostatic obstruction in poor surgical candidates. **Urology**, v. 65, n. 4, p. 670-674, 2005.

KUO, H. C. Recovery of detrusor function after urethral botulinum A toxin injection in patients with idiopathic low detrusor contractility and voiding dysfunction. **Urology**, v. 69, n. 1, p. 57-62, 2007.

LAROQUE, P. A. et al. Effects of chronic oral administration of a selective 5 α -reductase inhibitor, finasteride, on the dog prostate. **The Prostate**, v. 24, n. 2, p. 93-100, 1994.

LAROQUE, P. A. et al. 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.

LARSON, T. R. et al. Intraprostatic injection of botulinum toxin in the treatment of symptomatic LUTS, including sequential MRIS for accurate changes in size of the prostate. **Journal of Urology**, v. 173, suppl. 1, p. 376-377, 2005.

LATTIMER, J. C. The prostate gland. In: THRALL, D. E. (Ed.) **Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p. 499-511.

LEE, C.; KOZLOWSKI, J. M.; GRAYHACK, J. T. Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth. **The Prostate**, v. 31, n. 2, p. 131-138, 1997.

LEPOR, H.; KUHAR, M. J. Characterization and localization of the muscarinic cholinergic receptor in human prostatic tissue. **Journal of Urology**, v. 132, n. 2, p. 397-402, 1984.

LI, L.; SINGH, B. R. Isolation of synaptotagmin as a receptor for types A and E botulinum neurotoxins and analysis of their comparative binding using a new microtiter plate assay. **Journal of Natural Toxins**, v. 7, n. 3, p. 215-226, 1998.

LI, L.; SINGH, B. R. Spectroscopic analysis of pH-induced changes in the molecular features of type A botulinum neurotoxin light chain. **Biochemistry**, v. 39, n. 21, p. 6466-6474, 2000.

LIN, A. T. et al. Effect of orchiectomy on the alpha adrenergic contractile response of dog prostate. **The Journal of Urology**, v. 154, n. 5, p. 1930-1933, 1995.

LIN, A. T. et al. Effects of botulinum toxin A on the contractile function of dog prostate. **European Urology**, v. 52, n. 2, p. 582-589, 2007.

LIN, S. K.; QUEK, P. L. Intraprostatic and bladder-neck injection of botulinum A toxin in treatment of males with bladder-neck dyssynergia: a pilot study. **European Urology**, v. 53, n. 3, p. 620-627, 2008.

LLOYD, J. W.; THOMAS, J. A.; MAWHINNEY, M. G. Androgens and estrogens in the plasma and prostatic tissue of normal dogs and dogs with benign prostatic hypertrophy. **Investigative Urology**, v. 13, n. 3, p. 220-222, 1975.

LOWSETH, L. A. et al. Age-related in the prostate and testes of the beagle dog. **Veterinary Pathology**, v. 27, n. 5, p. 347-353, 1990.

MACKENZIE, I. et al. The effects of purified botulinum neurotoxin type A on cholinergic, adrenergic and non-adrenergic, atropine-resistant autonomic neuromuscular transmission. **Neuroscience**, v. 7, n.4, p. 997-1006, 1982.

MARIA, G. et al. Relief by botulinum toxin of voiding dysfunction due to prostatitis. **Lancet**, v. 352, n. 9128, p. 625, 1998.

MARIA, G. et al. Relief by botulinum toxin of voiding dysfunction due to benign prostatic hyperplasia: results of a randomized, placebo-controlled study. **Urology**, v. 62, n. 2, p. 259-265, 2003.

MARINESE, D. et al. Mechanistic investigation of the adrenergic induction of ventral prostate hyperplasia in mice. **The Prostate**, v. 54, n. 3, p. 230-237, 2003.

MARTINS, M. I. M. **Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães**. 2005. 123f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

MATARASSO, S. L. Complications of botulinum A exotoxin for hyperfunctional lines. **Dermatologic Surgery**, v. 24, n. 4, p. 1249-1254, 1998a.

MATARASSO, S. L. The role of clostridium botulinum: a neurotoxin in clinical dermatology. **The Western Journal of Medicine**, v. 169, n. 4, p. 226, 1998b.

MEDEIROS JR, L. C.; LUNARDELLI, F. Avaliação ultra-sonográfica das patologias prostáticas em cães: aspectos e diagnóstico. **Nosso Clínico: Medicina Veterinária para Animais de Companhia**, v. 36, p. 22-30, 2003.

MEUNIER, F. A. et al. Dynamics of nerve terminal remodeling unveiled using SNARE-cleaving botulinum toxins: the extend and duration are dictated by the sites of SNAP-25 truncation. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 22, n. 4, p. 454-466, 2003.

MONTECUCCO, C. et al. Botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic applications. **Molecular Medicine Today**, v. 2, n. 10, p. 418-424, 1996.

MÜLLER, S. C. et al. Castration and erection. An animal study. **European Urology**, v. 15, n. 1-2, p. 118-124, 1988.

MURAKOSHI, M. et al. Immunolocalization of androgen receptor in canine prostatic hyperplasia – effect of antiandrogen. **The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 23, n. 5, p. 209-212, 1998.

MURAKOSHI, M.; IKEDA, R.; FUKUI, N. The effects of chlormadinone acetate (CMA), antiandrogen, on the pituitary, testis, prostate and adrenal gland of the dog with spontaneous benign prostatic hyperplasia. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 26, n. 3, p. 119-127, 2001.

MUZZI, L. A. L. **Próstata do cão: aspectos clínicos, radiográficos, ultrasonográficos e citológicos das afecções.** 1998. 75f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

NIU, Y. et al. Proliferation and differentiation of prostatic stromal cells. **BJU International**, v. 87, n. 4, p. 386-393, 2001.

NIU, Y. et al. Androgen and prostatic stroma. **Asian Journal of Andology**, v. 5, n. 1, p. 19-26, 2003.

ODERGREN, T. et al. A double blind, randomized, parallel group study of investigate the dose equivalence of Dysport and Botox in the treatment of cervical dystonia. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 64, n. 1, p. 6-12, 1998.

OLIVEIRA, E. G. et al. Afecções da próstata em cães na região de Botucatu, Estado de São Paulo. In: Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 1996, Jaboticabal. **Anais...**, p. 327.

OLSON, P. N. et al. Disorders of the canine prostate gland: pathogenesis, diagnosis, and medical therapy. **Compendium on Continuing Education – Small Animal**, v. 9, n. 6, p. 613-623, 1987.

ORIMA, H. et al. Short-term oral treatment of canine benign prostatic hypertrophy with chlormadinone acetate. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, n. 1, p. 139-141, 1995.

PAPA, F. O. et al. Coloração espermática segundo Karras modificado pelo emprego do Barbatimão (*Sthyphnodendrum barbatiman*). In: CONGRESSO DE BIOLOGIA MOLECULAR 5., 1986, Rio de Janeiro. **Anais...**, p. 86.

PARK, D. S. et al. Evaluation of short term clinical effects and presumptive mechanism of botulinum toxin type A as a treatment modality of benign prostatic hyperplasia. **Yonsei Medical Journal**, v. 47, n. 5, p. 706-714, 2006.

PENNEFATHER, J. N. et al. The autonomic and sensory innervation of the smooth muscle of the prostate gland: a review of pharmacological and histological studies. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 20, n. 4, p. 193-206, 2000.

PETER, A. T.; STEINER, J. M.; ADAMS, L. G. Diagnosis and medical management of prostate disease in the dog. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 10, n. 1, p. 35-42, 1995.

PHELAN, M. W. et al. Botulinum toxin urethral sphincter injection to restore bladder emptying in men and women with voiding dysfunction. **The Journal of Urology**, v. 165, n. 4, p. 1107-1110, 2001.

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

RANOUX, D. et al. Respective potencies of Botox and Dysport: a double blind, randomized, crossover study in cervical dystonia. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 72, n. 4, p. 459-462, 2002.

RAVINDRANATH, N. et al. Epidermal growth factor modulates the expression of vascular endothelial growth factor in the human prostate. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 3, p. 432-443, 2001.

READ, R. A.; BRYDEN, S. Urethral bleeding as a presenting sign of benign prostatic hyperplasia in the dog: a retrospective study (1979-1993). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 31, n. 3, p. 261-267, 1995.

REITZ, A. et al. European experience of 200 cases treated with botulinum-A toxin injections into the detrusor muscle for urinary incontinence due to neurogenic detrusor overactivity. **European Urology**, v. 45, n. 4, p. 510-515, 2004.

ROSALES, R. L.; BIGALKE, H.; DRESSLER, D. Pharmacology of botulinum toxin: differences between type A preparations. **European Journal of Neurology**, v. 13, suppl. 1, p. 2-10, 2006.

RUGGIERI, M. R. et al. Human prostate muscarinic receptor subtypes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 274, n. 2, p. 976-982, 1995.

RUSNACK, S. R.; KAPLAN, S. A. The use of botulinum toxin in men with benign prostatic hyperplasia. **Reviews in Urology**, v. 7, n. 4, p. 234-236, 2005.

SANDERS, D. B.; MASSEY, W.; BUCKLEY, E. G. Botulinum toxin for blepharospasm: single-fiber EMG studies. **Neurology**, v. 36, n. 4, p. 545-547, 1986.

SCHANTZ, E. J.; JOHNSON, E. A. Botulinum toxin: the story of its development for the treatment of human disease. **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 40, n. 3, p. 317-327, 1997.

SCHLOTZHAUER, S.; LITTELL, R. C. **SAS system for elementary statistical analysis**. 2. ed. Cary: SAS Institute, 1997. p. 456.

SCHURCH, B. et al. Botulinum-A toxin for treating detrusor hyperreflexia in spinal cord injured patients: a new alternative to anticholinergic drugs? Preliminary results. **The Journal of Urology**, v. 164, n. 3, p. 692-697, 2000.

SCHURCH, B.; REITZ, A. Botox in urology: a new treatment modality without limitations? **EAU Update Series**, v. 2, p. 170-178, 2004.

SHIDAIFAT, F.; GHARAIBEH, M.; BANI-ISMAIL, Z. Effect of castration on extracellular matrix remodeling and angiogenesis of the prostate gland. **Endocrine Journal**, v. 54, n. 4, p. 521-529, 2007.

SHIMIZU, M. et al. Effect of chlormadinone acetate-pellet implantation on the volume of prostate, peripheral blood levels of sex hormones and semen quality in the dog. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, n. 3, p. 395-399, 1995.

SHONE, C. C.; TRANTER, H. S. Growth of clostridia and preparation of their neurotoxins. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 195, p. 143-160, 1995.

SILVA, J. et al. Intraprostatic botulinum toxin type A injection in patients unfit for surgery presenting with refractory urinary retention and benign prostatic enlargement. Effect on prostate volume and micturition resumption. **European Urology**, v. 53, n. 1, p. 153-159, 2008.

SIMPSON, L. L. Kinetic studies on the interaction between botulinum toxin type A and the cholinergic neuromuscular junction. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 212, n. 1, p. 16-21, 1980.

SIMPSON, L. L. Molecular pharmacology of botulinum toxin and tetanus toxin. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 26, p. 427-453, 1986.

SIMPSON, L. L.; DASGUPTA, B. R. Botulinum neurotoxin type E: studies on mechanism of action and on structure and activity relationships. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 224, n. 1, p. 135-140, 1983.

SIRINARUMITR, K. et al. Effects of finasteride on size of the prostate gland and semen quality in dogs with benign prostatic hypertrophy. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 8, p. 1275-1280, 2001.

SOUZA, F. F. **Estudo da próstata canina pelo exame ultra-sonográfico, palpação retal, dosagens séricas de testosterona, 17 β -estradiol, fosfatase ácida prostática e antígeno específico prostático**. 1998. 85f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

SOUZA, F. F. Hiperplasia prostática benigna. In: GOBELO, C. **Temas de reproducción de caninos y felinos por autores latinoamericanos**. Buenos Aires: Gráfica Latina, 2004. p. 71-83.

SPOSITO, M. M. M. Toxina botulínica tipo A - propiedades farmacológicas e uso clínico. **Acta Fisiátrica**, v. 11, suppl. 1, p. S7-S44, 2004.

STEERS, W. D. 5 α -reductase activity in the prostate. **Urology**, v. 58, suppl. 6a, p. 17-24, 2001.

STRZEZEK, R.; JANOWSKI, T.; BARANSKI, W. Effects of finasteride on the functioning of the prostate gland and semen quality. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 60, n. 2, p. 211-214, 2004.

SUDHOF, T. C. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. **Nature**, v. 375, n. 6533, p. 645-653, 1995.

TAKEZAWA, Y. et al. Effects of a new steroidal antiandrogen, TZP-4238 (17 α -acetoxy-6-chloro-2-oxa-4, 6-pregnadiene-3, 20-dione), on spontaneously developed canine benign prostatic hyperplasia. **The Prostate**, v. 27, n. 6, p. 321-328, 1995.

THOMAS, C. A. et al. Botulinum-A toxin: an exciting new treatment option for prostatic disease. **International Journal of Clinical Practice**, v. 60, suppl. 151, p. 33-37, 2006.

TRACHTENBERG, J.; HICKS, L. L.; WALSH, P. C. Androgen- and estrogen-receptor content in spontaneous and experimentally induced canine prostatic hyperplasia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 65, n. 5, p. 1051-1059, 1980.

TSUTSUI, T. et al. Effect of osaterone acetate administration on prostatic regression rate, peripheral blood hormone levels and semen quality in dogs with benign prostatic hypertrophy. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 4, p. 453-456, 2001.

TURTON, K.; CHADDOCK, J. A.; ACHARYA, K. R. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 11, p. 552-558, 2002.

VAALASTI, A.; HERVONEN, A. Autonomic innervation of the human prostate. **Investigative Urology**, v. 17, n. 4, p. 293-297, 1980.

VENTURA, S.; PENNEFATHER, J. N.; MITCHELSON, F. Cholinergic innervation and function in the prostate gland. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 94, n. 1-2, p. 93-112, 2002.

WALSH, P. C. This month in investigative urology: the role of estrogen/androgen synergism in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. **Journal of Urology**, v. 139, p. 826, 1988.

WALSH, P. C.; WILSON, J. D. The induction of prostatic hypertrophy in the dog with androstanediol. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 57, p. 1093-1097, 1976.

WILSON, J. D. The pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. **The American Journal of Medicine**, v. 68, n. 5, p. 745-756, 1980.

WINTER, M. L. et al. Induction of benign prostatic hyperplasia in intact dogs by near-physiological levels of 5 α -dihydrotestosterone and 17 β -estradiol. **The Prostate**, v. 26, n. 6, p. 325-333, 1995.

WINTER, M. L.; LIEHR, J. G. Possible mechanism of induction of benign prostatic hyperplasia by estradiol and dihydrotestosterone in dogs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 136, n. 2, p. 211-219, 1996.

WITTE, L. P. W. et al. Cholinergic innervation and muscarinic receptors in the human prostate. **European Urology** (2007), doi: 10.1016/j.eururo.2007.12.007 (In Press).

YASUSHIRO, S. et al. Comparison of histological compositions and apoptosis in canine spontaneous benign prostatic hyperplasia treated with androgen suppressive agents chlormadinone acetate and finasteride. **Journal of Urology**, v. 165, n. 1, p. 289-293, 2001.

ZHOU, L. Q. et al. Expression and purification of the light chain of botulinum neurotoxin A: a single mutation abolishes its cleavage of SNAP-25 and neurotoxicity after reconstitution with the heavy chain. **Biochemistry**, v. 34, n. 46, p. 15175-15181, 1995.