

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 23/06/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO EPIGENÉTICA DOS GENES *NKX3.1* E *CDH1* E EXPRESSÃO
DO C-MYC, NKX3.1 E E-CADERINA POR IMUNO-HISTOQUÍMICA EM
MICROARRANJO DE TECIDO (TMA) DE LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS E
NEOPLÁSICAS NA PRÓSTATA DE CÃES

CARLOS EDUARDO FONSECA ALVES

Botucatu-SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO EPIGENÉTICA DOS GENES *NKX3.1* E *CDH1* E EXPRESSÃO
DO C-MYC, NKX3.1 E E-CADERINA POR IMUNO-HISTOQUÍMICA EM
MICROARRANJO DE TECIDO (TMA) DE LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS E
NEOPLÁSICAS NA PRÓSTATA DE CÃES

CARLOS EDUARDO FONSECA ALVES

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Renée Laufer
Amorim
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Silvia Regina
Rogatto
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Flavia Karina
Delella

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Alves, Carlos Eduardo Fonseca.

Avaliação epigenética dos genes NKX3.1 e CDH1 e expressão do C-MYC, NKX3.1 e E-Caderina por imuno-histoquímica em microarranjo de tecido (TMA) DE lesões pré-neoplásicas e neoplásicas na próstata de cães / Carlos Eduardo Fonseca Alves. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Renée Laufer Amorim

Coorientador: Silvia Regina Rogatto

Coorientador: Flavia Karina Delella

Capes: 50501062

1. Cães - Doenças. 2. Próstata - Câncer. 3. Metilação de DNA. 4. Western blotting. 5. Imunohistoquímica. 6. Análise de microarranjo. 7. Epigenética.

Palavras-chave: Canino; Carcinoma prostático; Metilação; Western Blotting; mRNA.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Renée Laufer Amorim
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ - UNESP - Botucatu

ProfªDrª Patricia Pintor Reis
Membro
Departamento de Cirurgia e Ortopedia
FMB – UNESP – Botucatu

Profª Drª Sandra Aparecida Drigo Linde
Membro
Departamento de Urologia
FMB – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Heidge Fukumasu
Membro
Departamento de Medicina Veterinária
FZA – USP – Pirassununga

Prof. Dr. Renato Lima Santos
Membro
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias
EV – UFMG – Belo Horizonte

Data da Defesa: 23 de junho de 2016.

Dedico a minha tese à minha mãe (Roseli Maria da Fonseca), meu pai (Carlos Alberto Alves) e meus irmãos (Ricardo H. F. Alves e Guilherme A. F. Alves) que, sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram durante toda a minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de realizar um agradecimento a todas as pessoas que diretamente ou indiretamente me auxiliaram durante a realização da minha tese de doutorado. Em especial:

Á minha **família** que sempre me incentivou, apoiou e participaram de toda minha jornada acadêmica. Obrigado pelo amor incondicional, pela torcida, pelos exemplos de trabalho e honestidade e por sempre estarem ao meu lado.

Ao meu companheiro, **Igor Simões Tiagua Vicente**, pelos anos de dedicação e amizade, por aguentar os momentos de mau humor e por sempre me apoiar em todas as decisões. Obrigado por estar ao meu lado durante esta caminhada.

Á minha querida orientadora, **Profª Drª Renée Laufer Amorim**, por ter aceitado me orientar durante o curso de doutorado, pelos conselhos e palavras carinhosas nos momentos de ansiedade, por dar asas aos seus alunos para que eles possam alçar voos mais altos. Obrigado por ser um exemplo de pessoa e pesquisadora e sempre lutar para nos oferecer as melhores condições de trabalho.

As minhas co-orientadoras, **Profª Drª Silvia Regina Rogatto** e **Profª Drª Flavia Karina Delella**, pelo apoio incondicional, por ceder as instalações de seus respectivos laboratórios para a realização desta pesquisa e por sempre terem um conselho nos momentos difíceis.

Á **Profª Drª Claudia Aparecida Rainho**, por todos os ensinamentos sobre cultura celular e por abrir as portas do seu laboratório. Obrigado pelos feriados e horários além do expediente destinados a me passar seus conhecimentos sobre culturas primárias. Seus ensinamentos foram essenciais para a minha pesquisa de doutorado e para minha vida profissional.

Á **Drª Sandra Aparecida Drigo Linde**, por todos os conselhos e os ensinamentos sobre biologia molecular. Gostaria de agradecer-lhe por sempre estar disposta a ajudar e a incrementar nossas ideias!! Obrigado por toda a ajuda durante a realização desta pesquisa.

A todos os amigos, funcionários, residentes pós-graduandos e professores do Setor de Patologia, em especial, à **Valeria Dalanezi**, **Juliano**

Nóbrega, Maury Raul, Diogo Zaroni, Luis Gabriel Calderón, Dona Deise e Maíra Martins, pelos ótimos anos de convivência, pela amizade, pela dedicação e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao **Marcio Carvalho**, por toda a ajuda e ensinamentos sobre extração de DNA, RNA e realização de RT-qPCR. Obrigado por sua ajuda na realização desta pesquisa.

Aos meus queridos amigos do laboratório NeoGene, em especial à **Maísa Pinheiro** e ao **Fabio Marchi**, por toda a ajuda durante realização do experimento no Hospital AC Camargo, pelo amizade e companheirismo durante nossas viagens à congressos e nas análises dos resultados desta pesquisa.

Á **Hellen Kuasne**, por a ajuda incondicional na realização das análises de metilação, por sempre pensar positivo e ter um bom conselho nos momentos difíceis. Obrigado por todos os ensinamentos sobre a técnica de metilação e pelo companheirismo.

Á **Marcela** e a **Lívia**, por serem amigas queridas e sempre me ajudarem nos momentos difíceis. São pessoas muito queridas que posso contar sempre!

Um agradecimento especial à **Priscila Emiko Kobayashi**, pelos momentos de descontração, pela amizade e companheirismo. Obrigado por me acompanhar nos cafés todas as manhãs e por sempre estar disposta a ajudar. Obrigado por fazer esta caminhada mais tranquila e divertida.

Aos queridos amigos da sessão técnica de pós-graduação da FMVZ-UNESP, Botucatu. Em especial para o **Carlos** e a **Patrícia** que sempre me ajudaram em todos os momentos requeridos.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão do auxílio financeiro para realização da pesquisa (Processo FAPESP: 2012/16068-0) e pela concessão da bolsa de doutorado (Processo FAPESP: 2012/18426-1).

Obrigado a todos!!!

LISTA DE ABREVIATURAS

CP.....	Carcinoma Prostático
FDA.....	<i>Food and Drug Administration</i>
VS.....	Vesícula seminal
ZC.....	Zona central
ZP.....	Zona periférica
ZT.....	Zona de transição
EFA.....	Estromafibromuscular anterior
INCA.....	Instituto Nacional do Câncer
PIN.....	Neoplasia Intraepitelial Prostática
PIA.....	Atrofia Inflamatória Proliferativa
HPB.....	Hiperplasia Prostática Benigna
PSA.....	Antígeno Prostático Canino

SUMÁRIO

RESUMO.	vii
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I	3
Introdução	10
Revisão de Literatura.	12
Objetivos.	23
CAPÍTULO II – TRABALHO CIENTÍFICO 1	24
CAPÍTULO III – TRABALHO CIENTÍFICO 2	49
CAPÍTULO IV – TRABALHO CIENTÍFICO 3	74
CAPÍTULO V – TRABALHO CIENTÍFICO 4	102
CONSIDERAÇÕES FINAIS	121
REFERÊNCIAS	122

FONSECA-ALVES, C.E. **Avaliação Epigenética dos Genes *NKX3.1* e *CDH1* e Expressão do C-MYC, *NKX3.1* e E-Caderina por Imuno-histoquímica em Microarranjo de Tecido (TMA) de Lesões Pré-neoplásicas e Neoplásicas Na Próstata De Cães**. Botucatu, 2016. 123p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A próstata canina é um bom modelo para estudos comparados entre o cão e o homem, uma vez que essas duas espécies desenvolvem espontaneamente carcinoma de próstata (CP). Para melhor caracterização do CP canino, a presente pesquisa foi dividida em quatro capítulos que avaliam diferentes aspectos dos CPs em cães. A atrofia inflamatória proliferativa (PIA) é uma lesão pré-neoplásica descritas em humanos e pouco estudada em cães. Nós caracterizamos essa lesão em cães e identificamos uma forte relação entre a localização topográfica da PIA com os CPs. Além disso, foi identificada a perda de expressão gênica e proteica de PTEN e AR na PIA. Esses fatores associados corroboram com o potencial pré-neoplásico desta lesão em cães. Um achado interessante foi a alta expressão de P63 na PIA e em um grupo de CP caninos. Para melhor caracterizar este grupo, foi avaliada a expressão imuno-histoquímica de diferentes citoqueratinas e outras proteínas relacionadas ao desenvolvimento do CP em humanos. Os carcinomas que apresentam expressão de P63 apresentaram padrões morfológicos com escore de *Gleason* alto e um fenótipo mais agressivo quando comparado à tumores que não apresentação expressão de P63. Posteriormente, a expressão gênica e proteica de E-caderina, *NKX3.1* e C-MYC foi avaliada em CP como marcadores nas diferentes lesões. Além disso, nós avaliamos a metilação como mecanismo regulatórios dos genes *CDH1* e *NKX3.1*. Foi possível identificar a perda de E-caderina e *NKX3.1* nos tumores, comparado à próstata normal bem como o aumento da expressão de C-MYC. A expressão de E-caderina teve relação com a sobrevida dos pacientes e a hipermetilação do gene *CDH1* é o possível mecanismo regulatório deste gene. Não foram encontradas alterações de metilação no promotor do gene *NKX3.1*, indicando outro mecanismo na regulação deste gene.

Palavras-chave: canino, carcinoma prostático, metilação, mRNA, *Western blotting*.

FONSECA-ALVES, C.E. **Epigenetic evaluation of NKX3.1 and CDH1 and immunohistochemistry expression of C-MYC, NKX3.1 and E-cadherin using tissue microarray (TMA) of pre-neoplastic and neoplastic prostate of dogs.** Botucatu, 2016. 123p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The canine prostate gland can be used as a model to human prostatic disease since dogs and men are the only species that spontaneously develop prostate carcinoma (PC). To better characterize the canine PC, this research was divided into four chapters that evaluated different aspects of the PC in dogs. The proliferative inflammatory atrophy (PIA) is a pre-neoplastic lesion described in humans and few studies in dogs describe it as a preneoplastic lesion. This study characterized PIA in dogs and identified a strong relationship between the PIA topography with PC. In addition, we identified the loss of PTEN and AR expression in PIA. These findings demonstrated the potential of PIA as a pre-neoplastic lesion in dogs. An interesting finding in this research was the high expression of P63 in PIA and a group of PC. This study found a group of PC showing P63 positive expression in neoplastic epithelial cells. Thus, these tumors were selected to better characterize them using immunohistochemistry. These tumors had an aggressive phenotype and presented high expression of AKT and C-MYC and loss of NKX3.1. Further, we selected a usual group of PC and evaluate the expression of E-cadherin, NKX3.1 and C-MYC. In addition, we evaluated the methylation as a regulatory mechanism of *CDH1* and *NKX3.1* genes. We have identified loss of E-cadherin and NKX3.1 in PC compared to normal prostate and C-MYC overexpression. The expression of E-cadherin was related to overall survival and Gleason score. The hypermethylation of *CDH1* can be the protein regulatory mechanism in canine PC. We did not find methylation alterations in *NKX3.1* promoter gene.

Keywords: canine, prostate cancer, methylation, mRNA, Western blotting.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2016 são esperados 68.800 novos casos de carcinoma prostático (CP), que é considerado como a segunda causa mais comum de mortes relacionadas ao câncer em homens com mais de 50 anos de idade. As estimativas mundiais apontam um crescimento em 25 vezes na incidência do CP, e este fato está associado ao diagnóstico precoce por meio do teste do Antígeno Prostático Específico (PSA) e o exame clínico de toque retal (INCA, 2016). Atualmente há uma grande discussão em torno do diagnóstico precoce do CP em humanos. As estatísticas apontam que 100% dos homens que chegarem aos 100 anos de idade, irão apresentar evidência histológicas de CP (INCA, 2016). No entanto, em 90% desses casos, os pacientes não irão apresentar progressão tumoral ou evolução clínica da doença (BANGMA et al., 2007). Assim, muitos pacientes idosos que apresentarem tumores indolentes podem passar por procedimento invasivos de forma desnecessária.

Na medicina veterinária, os dados relacionados à incidência das neoplasias prostáticas em cães são controversos. No entanto, há um consenso ao afirmar que em cães, o CP apresenta incidência menor que no homem. As afecções prostáticas benignas são frequentemente encontradas na clínica dos animais de companhia, especialmente em cães. As alterações da próstata mais comuns são a hiperplasia prostática benigna (HPB), a prostatite (FONSECA-ALVES et al., 2010) e os cistos prostáticos (FONSECA-ALVES et al., 2012). De acordo com JOHNSTON et al. (2000), 100% dos cães não castrados apresentaram alterações histológicas prostáticas com o avançar da idade. Em cães, não é reportada alta incidência de CP indolente. De acordo com a literatura veterinária, os CP são agressivos, altamente metastáticos e apresentam prognóstico desfavorável (LEROY & NORTHRUP, 2009). A próstata canina é considerada modelo para estudo comparativo da próstata humana, uma vez que essas são as únicas duas espécies em que ocorre espontaneamente o câncer prostático, neoplasia intraepitelial prostática (PIN), hiperplasia prostática benigna (HPB) (BOSTWICK et al., 2000) e a atrofia inflamatória proliferativa (PIA) (PALMIERI et al., 2014). O CP canino compartilha muitas características semelhantes ao do homem, e seria um

modelo de estudo para o CP invasivo/metastático (BELL et al., 1991; BOSTWICK & QIAN, 2004).

Na medicina humana, a imunomarcção de proteínas específicas para as células basais é utilizada para diferenciar lesões pré-neoplásicas dos carcinomas prostáticos (TAN et al., 2015). Dentre as principais lesões pré-neoplásicas descritas na medicina humana, destacam-se a PIN (ZHOU et al., 2003) e a PIA (DE MARZO et al., 1999). Em cães, existe uma controvérsia em relação a alta frequência e influência da PIN no desenvolvimento do CP e a literatura sobre a relação da PIA e os CP é escassa (PALMIERI et al., 2014). WATERS & BOSTWICK (1997) e BOSTWICK et al. (2000) encontraram uma alta incidência de PIN em cães (mais de 80% das amostras analisadas), no entanto, os autores avaliaram um número muito pequeno de amostras. MADEWELL et al. (2004) e AQUILINA et al. (1998) realizaram dois grandes estudos avaliando a frequência da PIN em amostras de tecido prostático canino e encontraram frequência de PIN menor que 3% no tecido prostático canino. Um estudo brasileiro (MATSUZAKI et al., 2010) identificou uma baixa frequência da PIN em lesões prostáticas caninas e em todos os casos, tratava-se de lesões de baixo grau (*low grade PIN*).

Em CP humanos, a perda da expressão das proteínas E-caderina e NKX3.1 é amplamente descrita na em tumores com alto escore de *Gleason* (DEBELEC-BUTUNER et al., 2014). A perda do NKX3.1 e E-caderina se correlaciona com a alta incidência de metástases dos pacientes. Outro gene importante para os CP em homens é a expressão do gene *C-MYC*. O gene *C-MYC* codifica a proteína MYC que apresenta papel de regulação da proliferação celular em condições fisiológicas (FARIA & RABENHORST, 2006). No CP em homens, a oncoproteína MYC apresenta expressão aumentada e, os níveis de transcritos do gene *C-MYC* se correlaciona com o desenvolvimento de metástases nos pacientes (ANDERSON et al., 2012). Em cães, apenas um estudo avaliou a expressão de NKX3.1 e MYC em CP caninos (FONSECA-ALVES et al., 2013).

Devido ao limitado conhecimento sobre a biologia dos CP em cães, a presente pesquisa realizou um estudo morfológico, imuno-histoquímico e molecular para caracterização de diferentes lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da próstata de cães.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerações Finais

Os carcinomas prostáticos caninos são neoplasias com comportamento biológico agressivo e, ao diagnóstico, a maioria dos pacientes apresenta metástase. Esse comportamento difere do homem, que apresenta em sua maioria, carcinomas de baixo grau. A próstata canina apresenta algumas particularidades histológicas, que devem ser consideradas ao utilizar o cão como modelo de estudo para doença humana. Destaca-se a descontinuidade da camada de células basais como a principal diferença entre as duas espécies. A atrofia inflamatória proliferativa (PIA) é uma lesão com alta incidência em cães e apresentar um alto potencial como lesão pré-neoplásica da prostática canina, assim como no homem.

O escore de avaliação utilizando a porcentagem de células negativas para o anticorpo E-caderina correlacionou-se com o prognóstico dos pacientes, bem como o escore de *Gleason*. Assim, para tumores que apresentam perda focal de E-caderina, este sistema pode ser útil na avaliação destes tumores, e demonstra a heterogeneidade entre as células de um mesmo tumor. A perda de NKX3.1 é frequente nos carcinomas prostáticos caninos e esta alteração pode ser relacionada com a agressividade dos tumores em cães.

As neoplasias prostáticas caninas podem ser utilizadas como modelo de estudo para os carcinomas em humanos, no entanto, deve-se ficar atento as particularidades de cada espécie para uma melhor aplicação desse modelo em oncologia comparada.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS UTILIZADAS NO CAPÍTULO I

1. ABATE-SHEN, C. et al. NKX3.1; PTEN mutant mice develop invasive prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Cancer Research*, v.63, p.3886–3890, 2003.
2. AQUILINA, J.W. et al. High grade prostatic intraepithelial neoplasia in military working dogs with and without prostate cancer. *Prostate*, v.36, n.3, p.189-193, 1998.
3. ARMBRUSTER, D.A. Prostatic-specific antigen: biochemistry, analytical methods and clinical application. *Clinical Chemistry*, v. 39, p. 181-195, 1993.
4. BANGMA, C.H. et al. Overdiagnosis and overtreatment of early-detected prostate cancer. *World Journal of Urology*, v.25 n.1, p.3-9, 2007.
5. BARSANTI, J.A.; FINCO, D.R. Moléstias prostáticas do cão. In: ETTINGER, S.J. *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. 3.ed. São Paulo: Malone, 1992, p.1941-1963.
6. BELL, F. W. et al. Clinical and pathologic features of prostatic adenocarcinoma in sexually intact and castrated dogs: 31 cases (1970-1987). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.199, p.1623-1630, 1991.
6. BOKHORST, L.P. et al. Do treatment differences between arms affect the main outcome of the European Randomized study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) Rotterdam? *Journal of Urology*, v.16, n.15, p. 295-305, 2015.
8. BOSTWICK, D. G.; RAMNANI, QIAN, J. Prostatic Intraepithelial Neoplasia: Animal Models 2000. *The Prostate*, v.43, p.286-294, 2000.
9. BROADDUS, W. C. et al. Antiproliferative effect of C-MYC antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides in malignant glioma cells. *Neurosurgery*, v.41, p.908-915, 1997.
10. BRYAN, J.N. et al. A population study of neutering status as a risk factor for canine prostate cancer. *Prostate*, v.67 n.11, p.1174-1181, 2007.
11. CANELLES, M. et al. Max and inhibitory C-MYC mutants induce erythroid differentiation and resistance to apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Oncogene*, v.14, 1315-27, 1997.

12. COMIJJN, J. et al. The Two-Handed E Box Binding Zinc Finger Protein SIP1 Downregulates E-Cadherin and Induces Invasion. *Molecular Cell*, v.7, n.6, 2001.
13. COTRAN, R. S. et al. T. O trato genital masculino. In: ROBBINS, Patologia Estrutural e Funcional. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000, p. 919-927.
14. DE MARZO AM et al. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *American Journal of Pathology*, v.155, n.6, p.1985-1992, 1999.
15. EISENMAN, R. N. Deconstructing Myc. *Genes & Development*, v.15, p.2023-2030, 2001.
16. ETZIONI, R. et al. Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. *Journal of the National Cancer Institute*, v.94, n.13, p.981-990, 2002.
17. FARIA, M. H. G.; RABENHORST, S. H. B. Impact of the C-MYC oncogene on cancer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.52, p.165-171, 2006.
18. FONSECA-ALVES C.E., et al. Prostatic histological evaluation in adult not castrated dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, n.3, p.10-29, 2010.
19. FONSECA-ALVES et al. Abscesso Prostático em Cães: Relato de 15 casos. *Semina: Ciências Agrárias*, v.33, n.3, p.1157-1164, 2012.
20. FONSECA-ALVES, C.E. et al. Alterations of C-MYC, NKX3.1, and E-cadherin expression in canine prostate carcinogenesis. *Microscopy Research and Technique*, v.76, n.12, p.1250-1256, 2013.
21. FONSECA-ALVES, C.E. et al. Evidence of epithelial-mesenchymal transition in canine prostate cancer metastasis. *Research in Veterinary Science*, v.100, p.176-81, 2015.
22. FRANK, S. R. et al. Binding of C-MYC to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes Dev.*, v.15, p.2069-82, 2001
23. GARTE, S. L. The c-myc oncogene in tumor progression. *Critical Review in Oncology*, v.4, p.435-449, 1993.

24. GELMANN, E. P. et al. Occurrence of NKX3.1 C154T Polymorphism in men with and without prostate cancer and studies of its effect on protein function. *Cancer Res.*, v.62, p.2654–2659, 2002.
25. GRIER, D. G. et al., The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *Journal of Pathology*, v.2, p.154-171, 2005.
26. INCA. Instituto Nacional de Câncer. Câncer de Próstata, 2016 . Disponível em:
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/definicao>.
27. JOHNSTON, S. D. et al. Prostatic disorders in dog. *Animal Reproduction Science*, v.60, p.405-415, 2000.
28. JONES, T. C. et al. Sistema Genital. In: *Patologia Veterinária*. São Paulo: Manole, 2000. p.1169-244.
29. KARR, J. F. et al. The presence of prostatic-specific antigen-related genes in primates and the expression of recombinant human prostate specific antigen in a transfected murine cell line. *Cancer Research*, v. 55, p. 2453-2462, 1995.
30. KORKMAZ, C. G. et al. Analysis of androgen regulated homeobox gene NKX3.1 during prostate carcinogenesis. *Journal of Urology*, v.172, p.1134–1139. 2004.
31. KRAWIEC, D. R.; HEFLIN, D. Study of prostatic disease in dogs: 177 cases (1981). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 200, n. 8, p.1119-1122, 1992.
32. LEAN, F.Z.; KONTOS, S.; PALMIERI, C. Expression of β -catenin and mesenchymal markers in canine prostatic hyperplasia and carcinoma. *Journal of Comparative Pathology*, v.150, n.4, p.373-81, 2014.
33. LEE, C.H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, v.40 n.3, p.565-575, 2011.
34. LEROY, B.E.; NORTHRUP, N. Prostate cancer in dogs: comparative and clinical aspects. *Veterinary Journal*, v.180, n.2, p. 149-162, 2009.
35. LI, Q.L. et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell*, v.109, p.113–124, 2002.
36. LIU, Y. C. et al. Telomerase and C-MYC expression in hepatocellular carcinomas. *European Journal of Surgical Oncology.*, v.30, p.384-390, 2004.

37. LOWSETH, L. A. et al. Age-related changes in the prostate and testes of the Beagle dog. *Veterinary Pathology*, v.27, p. 347-353, 1990.
38. LUSCHER, B.; EISENMAN, R. N. New light on Myc and Myb. *Genes & Development*, v.4, p.2025-2035, 1990.
39. MADY, E. et al. Chromosome 8 numerical aberration and C-MYC copy number gain in bladder cancer are linked to stage and grade. *Anticancer Research*, v.21, p.3167-73, 2001.
40. MADEWELL, B.R. et al. Canine prostatic intraepithelial neoplasia: is the comparative model relevant? *Prostate*, v.58, n.3, p.314-317, 2004.
41. MATSUZAKI, P. et al. Immunohistochemical characterization of canine prostatic intraepithelial neoplasia. *Journal of Comparative Pathology*, v.142, n.1, p.84-88, 2010.
42. ONCLERCQ R, et al. Exogenous C-MYC gene overexpression interferes with early events in F9 cell differentiation. *Oncogene Research*, v.4, p.293-302, 1999.
43. PALACIOS, J. et al. Anomalous expression of P-cadherin in breast carcinoma. Correlation with E-cadherin expression and pathological features. *American Journal of Pathology*, v.146, n.3, p.605-12, 1995.
44. PALMIERI, C. et al. A retrospective analysis of 111 canine prostatic samples: histopathological findings and classification. *Research in Veterinary Science*, v.97, n.3, p.568-573, 2014.
45. REIS-FILHO, et al. Novel and Classic Myoepithelial/Stem Cell Markers in Metaplastic Carcinomas of the Breast. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, v.11, n.1, p.1-8, 2003.
46. RYAN, K. M.; BIRNIE, G. D. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochemical Journal*, v.314, p.713-21, 1996.
47. RODRIGUES et al. The role of adhesion molecules and proliferation hyperplastic, pre neoplastic and neoplastic lesions in canine prostate. *Prostate Cancer*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2013.
48. SCIAVOLINO, P. J. et al. Tissue-specific expression of murine Nkx3.1 in the male urogenital system. *Developmental Dynamics*, v.209, p.127–138, 1997.
49. SAHA B., et al. Overexpression of E-cadherin and β -catenin proteins in metastatic prostate cancer cells in bone. *Prostate*, v.68, p.78-84, 2008.

50. SHAFIEE, R. et al. Diagnostic investigations of canine prostatitis incidence together with benign prostate hyperplasia, prostate malignancies, and biochemical recurrence in high-risk prostate cancer as a model for human study. *Tumor Biology*, 2014.
51. SONG H., et al. Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis. *Oncogene*, v.28, p.3307-3319, 2009.
52. SOUNG, M.C. Screening for Cancer: When to Stop? A Practical Guide and Review of the Evidence. *Medical Clinics of North America*, v.99, n.2, p.249-262, 2015.
53. STEADMAN, D. J. et al. DNA-binding sequence of the human prostate-specific homeodomain protein NKX3.1. *Nucleic Acids Research*, v.28, p.2389–2395, 2000.
54. SWINNEY, G. R. Prostatic neoplasia in five dogs. *Aust. Veterinary Journal*, v.76, p.664-674, 1998.
55. TAN, H.L. et al. Prostate adenocarcinomas aberrantly expressing p63 are molecularly distinct from usual-type prostatic adenocarcinomas. *Modern Pathology*, v.28, n.446-456, 2015.
56. TELEPIS, C. Upregulation of the oncogene c-myc on barrett's adenocarcinoma: induction of c-myc acidified bile acid in vitro. *Gut*, n.52, p.174-178, 2003.
57. TESKE, E. et al. Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.197, p.251-255, 2002.
58. VICHERAT, C. et al. Endoscopic treatment of the benign prostatic hyperplasia. *Revista Chilena de Urología*, v.68, p.284-288, 2003. Walsh PC. Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. *Journal of Urology*, v.170, n.1, p. 313-314, 2003.

59. WATABE, M. et al. Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. *The Journal of Cell Biology*, v.127, p.247-256, 1994.
60. WATERS, D.J.; BOSTWICK, D.G. The canine prostate is a spontaneous model of intraepithelial neoplasia and prostate cancer progression. *Anticancer Research*, v.17, v.3A, p.1467-1470, 1997.
61. ZHANG, H. et al. Loss of NKX3.1 Favors Vascular Endothelial Growth Factor-C Expression in Prostate Cancer. *Cancer Research*, v.68, p.8770-8778, 2008.
62. ZHENG, S. L. et al. Germ-line mutation of NKX3.1 cosegregates with hereditary prostate cancer and alters the homeodomain structure and function. *Cancer Research*, v.6, p.455-464, 2006.