

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

**MECANISMO DE TRANSDUÇÃO DE SINAL NA
PRÓSTATA DE CÃO: AVALIAÇÃO NAS VIAS DA p-
ERK1/2 E DA *CYR61***

Kellen de Sousa Oliveira

Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

2009

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

**MECANISMO DE TRANSDUÇÃO DE SINAL NA
PRÓSTATA DE CÃO: AVALIAÇÃO NAS VIAS DA p-
ERK1/2 E DA *CYR61***

Kellen de Sousa Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo

Co-orientadores: Profa. Dra. Renée Laufer Amorim

Prof. Dr. José Félix Pérez Gutiérrez

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL- SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro – 2009

Oliveira, Kellen de Sousa
O48m Mecanismo de transdução de sinal na próstata de cão: avaliação nas vias da p-ERK1/2 e da CYR61/ Kellen de Sousa Oliveira. – – Jaboticabal, 2009
 xxiv, 94 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Gilson Hélio Toniollo
Banca examinadora: Rosangela Zacarias Machado, Mirela Tinucci Costa, Eugênio Gonçalves de Araújo, Sebastião Roberto Taboga

Bibliografia

1. Fator de crescimento. 2. Hiperplasia prostática benigna. 3. displasias. 4. Biologia molecular I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.7

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

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

KELLEN DE SOUSA OLIVEIRA – Natural de Taguatinga-DF, nascida em 9 de maio de 1975, ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFGO) em março de 1997, concluindo-o em Fevereiro de 2002. Em Março de 2003 iniciou curso de mestrado pelo programa de pós-graduação em Ciência animal, área de concentração: Patologia, clínica e cirurgia pela mesma universidade, concluindo-o em fevereiro de 2005. Em março de 2005 iniciou o curso de doutorado pelo programa de pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP).

Se não houver frutos, valeu a beleza
das flores. . .

Se não houver flores, valeu a
sombra das folhas. . .

Se não houver folhas, valeu a
intenção da semente. . .

Henfil

Dedico

*aos meus pais Crispim Luiz de Oliveira (in
memorian) e Raimunda de Sousa Oliveira, à
minha filha Idaline D' Sousa Oliveira, aos
meus irmãos Sidnei de Sousa Oliveira, Elieser
de Sousa Oliveira, Dhayfy de Sousa Oliveira e
a minha cadela Agatha.*

CORDEL PARA KELLEN

Sabryna Gouveia Calazans
07/01/2009

Essa historia começou
Antes da defesa de seu Mestrado
Uma decisão ela tomou:
A de fazer o doutorado
Deixou sua família pra trás
E saiu do estado de Goiás
Levando mala e cadeado

Logo quando ela chegou
Pela cidade ficou encantada
No “perfil” ela se encaixou
E na Nutronco foi abrigada
Comprou a “motinha amarela”
E encheu logo o quarto de vela
Além da parede alaranjada

Mas por aqui ninguém a via
Estava sempre viajando
Mal chegava e já partia
Boa vida a de pós-graduando!
Queria ir para o estrangeiro
E para Espanha foi primeiro
O Tio Sam ficou esperando

Toda vez que volta de viagem
Diz que o regime vai começar
Come alface, cenoura e vagem
Mas a cerveja não pode cortar
Sopa instantânea de montão
Isso pra mim é obsessão
E ela insiste em continuar

Mas na vida do doutorando
Tem um negócio complicado
O tempo vai passando
E a tese vai ficando de lado
O prazo vai se esgotar
E o estresse aumentar
Tem quem fique alucinado

Quanto mais ela escrevia
Mais ela tinha pra inventar
Nunca vi tanta agonia
Para uma tese terminar
Foi assistindo televisão
Que finalizou a discussão
E a defesa poderia marcar

Finalmente ela terminou
Não quer saber de experimento
Uma casa nova já montou
Porque só pensa no casamento
Arroz com pequi ela vai cozinhar
E muita roupa no tanque vai lavar
Esperando, à noite, o maridão chegar

Na sua torcida nós ficaremos
Acompanhando seu sucesso
No futuro nos encontraremos
Em um bar ou algum congresso
Que muitos filhos você tenha
E que daqui uns anos você venha
Pra matar a saudade da Rua Penha!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me protegido e dado forças para o desenvolvimento e realização de mais um dos meus sonhos.

A fertilidade do espermatozóide do meu pai e do oócito da minha mãe, porque sem ela eu jamais teria nascido.

Ao Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo, por ter aceitado o desafio da minha orientação sem mesmo me conhecer, pelos valiosos ensinamentos e apoio irrestrito durante esses anos, pelos vários momentos de conversas descontraídas, pela liberdade de pensamento e a confiança depositada.

Aos meus co-orientadores Prof. Dr. José Félix Pérez Gutiérrez e Profa. Dra. Renée Laufer Amorim pelos esclarecimentos nos momentos de dúvidas, pela amizade e direcionamento que deram ao projeto.

A Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Laboratório de Reprodução e Coordenação de pós-graduação por permitir o desenvolvimento deste trabalho.

A Universidad Complutense de Madrid, aos Laboratórios de Reproducción animal e Sanidad Animal por permitir o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meu amigos de trabalhos em Madrid: Chiara, Javier Regidor, Luis Ortega, Gema García, Ester Collantes, Veronica, Adriana Aguado, Virginia, Henrique, Vanesa, Inmaculada, Aurora.

Ao estatístico e amigo Jorge Oliva Hernandez que mesmo de longe soube entender o projeto.

Agradecer 4 anos em poucas folhas.....tão difícil, mas vamos por partes como alguém um dia ensinou.....

Aos meus companheiros de repúblicas:

Naida Cristina Borges, pessoinha fundamental na minha vinda pra Jaboticabal, na fase de adaptação, em muitas diversões, pelos momentos de sábias conversas e pelos momentos não sóbrios.

Ao Márcio Antonio Brunetto, companheiro calmo, tranqüilo, divertido, inteligente e batalhador.

Sabryna Gouveia Calazans, grande e fiel companheira de Nutronco, carinhosa, engraçada, paciente e dedicada, um exemplo.

Simone Crestoni Fernandes, companheira animada, baladeira e dramática.

Eliana Teshima, essa mais ia que vinha, mas suas vindas sempre foram bem agradáveis.

Ana Gabriela Valério pelas excelentes conversas e agradáveis visitas a nossa Nutronco.

Ricardo Vasconcellos (nunca moramos juntos, mas a RickyMarc será sempre uma extensão da Nutronco) grande companheiro pra todas as horas.

Marco Augusto (Marquin): que pena que você chegando e eu saindo.

Aos meus irmãos pela ciência:

Valeska Rodrigues e Diogo José Cardilli, sem palavras pra agradecer as ajudas que vocês me deram, os momentos únicos que vivi com cada um. Meu muito obrigado de coração.

Aos meus companheiros de MIV canino

Marco Antonio Machado, Ana Paula Coelho Ribeiro, Maricy Apparicio Ferreira, Eliandra Pires que me apresentaram um mundo desconhecido e fascinante do cultivo de células.

Aos meus companheiros de Laboratório de Reprodução/ FCAV/UNESP: Juliana Borges (e conseqüentemente o Márcio de agregado), Naiara Costa, Tatiana Almeida, Aline Lúcio, Ana Paula Perine, Max Rezende, Felipe Perecin, Danilas Salinete, Eliana Gazoto, Clara Slade, Maria Emília, Mabel Cordeiro, Rubia Bueno, Marcelo Bezerra, Robertinha. Aos funcionários Roberta, Ivo, Isabel e Edson.

Aos colegas do Setor de Obstetrícia Veterinária do HV/FCAV/UNESP.

Aos professores do setor de Reprodução animal: Cesar Roberto Esper, Joaquim Manzano Garcia, Francisco Leite, Paulo Henrique Franceschine, Vera Hossepian e Wilter Ricardo Russo.

Aos professores Júlio Carlos Canola, João Pisauro, Carlos Augusto Valadão, José Wanderlei Catellan.

Ao Dir. do Centro de Controle e Zoonoses da Cidade de Sertãozinho, Dr. João Longhi.

A Gláucia Bueno (Hasgoinha) e ao Milton Moraes (Hasgoinho) pelos momentos inesquecíveis em Ithaca-NY.

Ao meu namorado Wanderson Ferreira pela paciência nas idas e vindas.

Aos Professores da Escola de Veterinária da UFG, Luiz Antonio Franco da Silva, Maria Clorinda Soares Fioravanti, Paulo Henrique Jorge da Cunha e Luiz Augusto Batista Brito, que mesmo longe sempre se interessaram pelo meu trabalho e tão bem me receberam em minhas inúmeras visitas.

Aos colegas da Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (ANCLIVEPA-BRASIL).

As minhas amigas de Goiânia, Débora Pereira Garcia Melo e Andréia Vitor Couto do Amaral pela força dada, mesmo que distante, em todos os momentos.

A FAPESP pela bolsa de doutorado nacional e reserva técnica.

A CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche e a oportunidade de viver fora do país e conhecer outra realidade.

Aos animais utilizados no experimento.

Ao Alberto Santos Dumont por ter inventado o avião que facilitou tantas idas e vindas.

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho,

meu muitíssimo obrigado.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Descrições anatômica, histológica e funcional da próstata canina	3
2.2 Doenças prostáticas no cão	4
2.2.1 Prostatite.....	5
2.2.2 Hiperplasia prostática benigna.....	6
2.2.3 Neoplasia prostática intraepitelial	7
2.2.4 Neoplasias prostáticas.....	7
2.3 CYR61	8
2.4 Família do Fator de Crescimento Epidérmico	9
2.4.1 Fator de Crescimento Epidérmico.....	10
2.4.2 Fator de Crescimento Transformante-alpha (TGF- α)	10
2.5 Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFr)	12
2.6 Proteína quinase mitógeno – ativada (MAPK) e sua via de transdução de sinal ..	14
2.7 Interação entre fatores de crescimento e proteínas	16
3 OBJETIVOS	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Colheita do material	20
4.2 Diagnóstico Anatomopatológico.....	21
4.3 Imunoistoquímica (IHQ)	22
4.4 “Western Blotting” (W. B.)	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 Avaliação morfológica	28
5. 2 Diagnóstico e avaliação histopatológica	30

5.3 Avaliação imunoistoquímica.....	38
5.3.1 Avaliação da proteína <i>CYR61</i> nas diferentes classificações de HPB versus N	38
5.3.2 Avaliação da proteína <i>CYR61</i> nos diagnósticos de P versus N.....	39
5.3.3 Avaliação da proteína <i>CYR61</i> nos diagnósticos de Displasia ou PIN versus N	39
5.3.4 Avaliação do fator de crescimento EGF nas diferentes classificações de HPB versus N.....	44
5.3.5 Avaliação do fator de crescimento EGF nos diagnósticos de P versus N.....	45
5.3.6 Avaliação do fator de crescimento EGF nos diagnósticos de Displasia ou PIN versus N.....	45
5.3.7 Avaliação do fator de crescimento TGF- α nas diferentes classificações de HPB versus N	50
5.3.8 Avaliação do fator de crescimento TGF- α nas diferentes classificações de P versus N.....	51
5.3.9 Avaliação do fator de crescimento TGF- α nas diferentes classificações de Displasia ou PIN versus N	51
5.3.10 Avaliação do EGFr nas diferentes classificações de HPB versus N.....	56
5.3.11 Avaliação do EGFr nas diferentes classificações de P versus N.....	57
5.3.12 Avaliação do fator de crescimento EGFr nas diferentes classificações de Displasia ou PIN versus N	57
5.3.13 Avaliação da proteína p-ERK1/2 nas diferentes classificações de HPB versus N	62
5.3.14 Avaliação da proteína p-ERK1/2 nas diferentes classificações de P versus N	63

5.3.15 Avaliação da proteína p-ERK1/2 nas diferentes classificações de Displasia ou PIN versus N.....	63
5.4 Correlação entre as intensidades das proteínas e fatores de crescimento com os fragmentos de próstatas normais e com diferentes classificações de HPB.....	67
5.5 Avaliação Western Blotting (W.B.)	68
5.5.1 Avaliação do CYR61	68
5.5.2 Avaliação do EGF	69
5.5.3 Avaliação do TGF- α	70
5.5.4 Avaliação do EGFr.....	71
5.5.5 Avaliação do p-ERK 1/2.....	72
6 CONCLUSÃO.....	74
7 REFERÊNCIAS.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
Ac	Anticorpo
AP1	Ativador de proteína 1
BSA	Soro Albumina Bovina
BCA	Ácido bicinônico
ca	Canino
Ca ²⁺	Íon cálcio
c-AMP	Adenosina Monofosfato cíclico
CCN	Família conectivo cisteína nefroblastoma
CE	Célula endotelial
CHPB	Complexo hiperplasia prostática benigna
cip 1	Ciclina-dependente de inibidor de p21
c-fos	Protoncogene que codifica a proteína Fos
c-Jun	Protoncogene que codifica a proteína Jun
CO ₂	Dioxido de carbono
CM	Célula mononuclear
cmg	Camundongo
c-Raf-1	Proteína quinase quinase quinase
CTGF	Fator de crescimento do tecido conectivo
<i>CYR61</i>	Proteína rica em cisteína, 61 kilodaltons
DAB	3,3'-diaminobenzidine–tetrahydrochloride
DHT	Diidrotetosterona
DNA	Ácido dextrorribonucleico
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFr/ERBb1/HER	Receptor do fator de crescimento epidermal
ELK1	Dominio de proteína ETS
EPR	Epiregulina
ERK	Proteína quinase regulada extracelularmente
F	Fibroblasto
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FGF2	Fator de crescimento fibroblástico 2
FML	Fibra muscular lisa

GRB2	Receptor do fator de crescimento da proteína 2
GTP	Guanosina 5 trifosfato
HB-EGF	Fator de crescimento epidermal ligado a heparina
hmt	Hamster
HPB	Hiperplasia prostática benigna
HPB-e	Hiperplasia prostática benigna do tipo estromal
HPB-ep	Hiperplasia prostática benigna do tipo epitelial
hu	Humano
IF	Imunofluorescência
IHQ	Imunoistoquímica
IL-6 e IL-7	Interleucinas 6 e 7
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
kDa	kilo Dalton
KO	Knockout
LTP	Long-term potentiation
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MAPKK	Proteína quinase quinase
MAPKKK	Proteína quinase quinase quinase
mc	Monoclonal
MEC	Meio extracelular
MEK 1/2	Proteína quinase quinase
MKP-1	MAPK fosfatase-1
MLA	Musculatura lisa das artérias e/ou arteríolas
NO	Óxido nítrico
Nov	Nephoblastoma overexpressed gene
PBS	Salina fosfato tamponada
PC	Peso cães
pc	Policlonal
PC12	Linhagem de célula do feocromocitoma
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
p-ERK	Proteína quinase regulada extracelularmente fosforilada
PIN	Neoplasia prostática intraepitelial
PI3K	Fosfoinositol 3 quinase
PLCy	Fosfolipase Cy

PP	Peso próstata
PTB	Ligação de fosfotirosina
p38 MAPK	Proteína quinase p38
Ras ou Rho	Small GTPase
Rsk	Ribosomal S6 kinase
rt	Rato
RTK	Receptor tirosina kinase
SAS	Sistema de análise de estatística
SH2 (SHC)	Domínio SH2
SOS	“son of sevenless”
STAT	Proteína de transdução de sinal e ativação de transcrição
TBS	Solução tampão de Tris - HCL
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TGF- α	Fator de crescimento transformador alpha
TNF α	Fator de necrose Tumoral α
VEGF	Fator de crescimento do endotelio vascular
VP	Volume próstata
VPF	Fator de permeabilidade vascular
W.B.	Western Blotting
β -TC	Beta celulina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquematização proposta para a integração da proteína <i>CYR61</i> , dos fatores de crescimento EGF e TGF- α , do receptor EGFr com a rota de transdução de sinal da proteína MAP quinase p-ERK1/2, baseado em LEASK & ABRAHAM, (2006); PEDERSEN & POULSEN, (2006) e ARAÚJO, (2001).....	18
Figura 2	Fotografia de próstata de cão indicando os locais dos cortes efetuados para cada método de conservação. Fonte: LAUFER-AMORIM, 2001.....	20
Figura 3	Distribuição percentual dos diagnósticos histológicos de próstatas de cães oriundos do Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Sertãozinho-SP.....	30
Figura 4	Distribuição percentual dos diagnósticos histológicos de fragmentos de próstatas de cães oriundos do Centro de Zoonoses da cidade de Sertãozinho-SP.....	32
Figura 5	Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino normal (A), prostatite destacando infiltrado inflamatório (B), HPB-e destacando hiperplasia estromal (C) e HPB-ep destacando hiperplasia epitelial glandular (D), HE, obj. 20x.....	36
Figura 6	Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino com CHPB destacando proliferação epitelial (círculo), proliferação estromal (caixa) e áreas císticas (seta) (A, HE, obj. 10x), displasia destacando área displásicas (B, HE, obj. 40x), Adenocarcionoma destacando celular tumoradas (C, HE, obj. 20x).....	37
Figura 7	Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino normal (A), HPB-ep (B) e HPB-e (C), marcado com a proteína <i>CYR61</i> , evidenciando nas setas:	

	componente estromal (vermelha) e componente epitelial (preta), método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.....	42
Figura 8	Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino com diagnóstico de CHPB (A), prostatite (B) e displasia (C), marcado com a proteína <i>CYR61</i> , evidenciando nas setas: componente estromal (vermelha) e componente epitelial (preta), método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.....	43
Figura 9	Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino normal (A), HPB-ep (B) e HPB-e (C), marcado com a proteína EGF, evidenciando nas setas: componente estromal (vermelha) e componente epitelial (preta), método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.....	48
Figura 10	Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino com diagnóstico de CHPB (A), prostatite (B) e displasia (C), marcado com a proteína EGF, evidenciando nas setas: componente estromal (vermelha) e componente epitelial (preta), na caixa, componentes estromais e epiteliais, método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.....	49
Figura 11	Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino normal (A), HPB-ep (B) e HPB-e (C), marcado com a proteína TGF- α , evidenciando na seta: componente epitelial, método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.....	54
Figura 12	Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino com diagnóstico de CHPB (A), prostatite (B) e displasia (C), marcado com a proteína	

	TGF- α , evidenciando nas setas: componente estromal (vermelha) e componente epitelial (preta), método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.....	55
Figura 13	Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino normal (A), HPB-ep (B) e HPB-e (C), marcado com a proteína EGFr, evidenciando na seta: componente epitelial, método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.....	60
Figura 14	Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino com diagnóstico de CHPB (A), prostatite (B) e displasia (C), marcado com a proteína EGFr, evidenciando nas setas: componente estromal (vermelha) e componente epitelial (preta), método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.....	61
Figura 15	Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino normal (A), HPB-ep (B) e HPB-e (C), marcado com a proteína p-ERK 1/2, evidenciando nas setas: componente estromal (vermelha) e componente epitelial (preta), método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.....	65
Figura 16	Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino com diagnóstico de CHPB (A), prostatite (B) e displasia (C), marcado com a proteína p-ERK 1/2, evidenciando nas setas: componente estromal (vermelha) e componente epitelial (preta), método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.....	66
Figura 17	Imagem radiográfica escaneada da banda da proteína <i>CYR61</i> , bem como o marcador molecular, detectada por quimiluminescência, em próstatas de cães com prostatite (1), HPB-ep (2), HPB-e (3), CHPB (4) e displasia (5) e	

	útero hígido de cadelas (6).....	68
Figura 18	Imagem radiográfica escaneada da banda da proteína EGF, bem como o marcador molecular, detectada por quimiluminescência, em próstatas normais (1), prostatite (2), HPB-ep (3), HPB-e (4), CHPB (5) e displasia (6).....	69
Figura 19	Imagem radiográfica escaneada da banda da proteína TGF- α , bem como o marcador molecular, detectada por quimiluminescência, em próstatas normais (1), prostatite (2), HPB-ep (3), HPB-e (4), CHPB (5), displasia (6) e útero (7).....	70
Figura 20	Imagem radiográfica escaneada da banda da proteína EGFr, bem como o marcador molecular, detectada por quimiluminescência, em próstatas normais (1), prostatite (2), HPB-e (3), CHPB (4).....	71
Figura 21	Imagem radiográfica escaneada da banda da proteína EGF, bem como o marcador molecular, detectada por quimiluminescência, em próstatas com prostatite (1), HPB-ep (2), HPB-e (3), CHPB (4), displasia (5) e útero (6).....	72

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Sinais clínicos associados com as doenças prostáticas no cão	5
Quadro 2	Descrição dos clones, procedência, especificidade e diluição dos anticorpos utilizados na IHQ, em tecidos prostáticos caninos.....	23
Quadro 3	Descrição dos clones, procedência, especificidade e diluição dos anticorpos utilizados no W.B., em tecidos prostáticos caninos.....	26
Quadro 4	Descrição da diluição do anticorpo secundário e os tempos em que as membranas permaneceram na solução reveladora e filme radiográfico.....	26
Tabela 1	Médias $\pm$ erro padrão da média para os parâmetros peso cão (PC), peso próstata (PP) e volume próstata (VP) para os animais que apresentaram próstatas normais e com diferentes graus de HPB.....	29
Tabela 2	Diagnóstico histológico das próstatas dos 29 cães oriundos do Centro de Zoonoses da cidade de Sertãozinho-SP.....	30
Tabela 3	Diagnóstico histológico de fragmento cranial, medial e caudal das 29 próstatas de cão colhidas no Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Sertãozinho-SP.....	31
Quadro 5	Componentes estromais e epiteliais acinar que apresentaram maior destaque na marcação para a proteína <i>CYR61</i> em fragmentos prostáticos caninos classificados como normais e diferentes graus de hiperplasia prostática benigna (HPB).....	38
Tabela 4	Médias $\pm$ erro padrão da média para intensidade da marcação e área tingida com a proteína <i>CYR61</i> em fragmentos de próstata de cão.....	38
Quadro 6	Componentes estromais e epiteliais acinar que apresentaram maior destaque na marcação para a proteína <i>CYR61</i> em fragmentos prostáticos caninos normais e com prostatite.....	39

Quadro 7	Componentes estromais e epiteliais acinar que apresentaram maior destaque na marcação para a proteína <i>CYR61</i> em fragmentos prostáticos caninos normais e com displasia ou PIN.	40
Quadro 8	Componentes estromais e epiteliais acinar que apresentaram maior destaque na marcação do EGF em fragmentos prostáticos caninos classificados como normais e com diferentes graus de hiperplasia prostática benigna (HPB).....	44
Tabela 5	Médias $\pm$ erro padrão da média para intensidade da marcação e área tingida com o EGF em fragmentos de próstata de cão.....	44
Quadro 9	Componentes estromais e epiteliais que apresentaram maior marcação para o EGF nos fragmentos prostáticos normais e com prostatite de cão.....	45
Quadro 10	Componentes estromais e epiteliais que apresentaram maior marcação para o EGF nos fragmentos prostáticos caninos normais e com displasia ou PIN.....	45
Quadro 11	Componentes estromais e epiteliais acinar que apresentaram maior destaque na marcação para o TGF- α em fragmentos prostáticos de cão classificados como normais e com diferentes graus de hiperplasia prostática benigna (HPB).....	50
Tabela 6	Médias $\pm$ erro padrão da média para intensidade da marcação e área tingida com o TGF- α em fragmentos de próstata de cão.....	50
Quadro 12	Componentes estromais e epiteliais que apresentaram maior marcação para o TGF- α nos fragmentos prostáticos normais e com prostatite de cão.....	51
Quadro 13	Componentes estromais e epiteliais que apresentaram maior marcação para o TGF- α nos fragmentos prostáticos caninos normais e com displasia ou PIN.....	52
Quadro 14	Componentes estromais e epiteliais acinar que apresentaram maior destaque na marcação para o EGFr em fragmentos prostáticos de cão classificados como normais e com diferentes	

	graus de hiperplasia prostática benigna (HPB).....	56
Tabela 7	Médias $\pm$ erro padrão da média para intensidade da marcação e área tingida com a proteína EGFr em fragmentos de próstata de cão.....	56
Quadro 15	Componentes estromais e epiteliais que apresentaram maior marcação para o EGFr nos fragmentos prostáticos normais e com prostatite de cão.....	57
Quadro 16	Componentes estromais e epiteliais que apresentaram maior marcação para o EGFr nos fragmentos prostáticos caninos normal e com displasia ou PIN.....	57
Quadro 17	Componentes estromais e epiteliais acinar que apresentaram maior destaque na marcação para a p-ERK1/2 em fragmentos prostáticos de cão classificados como normais e com diferentes graus de hiperplasia prostática benigna (HPB).....	62
Tabela 8	Médias $\pm$ erro padrão da média para intensidade da marcação e área tingida com a proteína p-ERK1/2 em fragmentos de próstata de cão.....	62
Quadro 18	Componentes estromais e epiteliais que apresentaram maior marcação para a proteína p-ERK1/2 nos fragmentos prostáticos caninos normais e com prostatite.....	63
Quadro 19	Componentes estromais e epiteliais que apresentaram maior marcação para a proteína p-ERK1/2 nos fragmentos prostáticos caninos normais e com displasia ou PIN.....	63
Quadro 20	Peso molecular (kDa) da proteína <i>CYR61</i> nos fragmentos prostáticos analisados por Western Blotting.....	69
Quadro 21	Peso molecular (kD) da proteína EGF nos fragmentos prostáticos analisados por Western Blotting e valor médio.....	70
Quadro 22	Peso molecular (kD) da proteína TGF- α nos fragmentos prostáticos analisados por Western Blotting e valor médio.....	71
Quadro 23	Peso molecular (kD) da proteína EGFr nos fragmentos	

	prostáticos analisados por Western Blotting e valor médio.....	72
Quadro 24	Peso molecular (kD) da proteína p-ERK 1/2 nos fragmentos prostáticos analisados por Western Blotting e valor médio.....	73

MECANISMO DE TRANSDUÇÃO DE SINAL NA PRÓSTATA DE CÃO: AVALIAÇÃO NAS VIAS DA p-ERK1/2 E DA *CYR61*

RESUMO

O aumento da glândula prostática canina com o envelhecimento pode ser decorrente de uma proliferação excessiva do estroma e epitélio acinar, uma diminuição na taxa de apoptose, entre outros. Esses processos celulares são mediados por hormônios, fatores de crescimento e proteínas, dentre elas podemos citar as proteínas *CYR61* e p-ERK1/2 e os fatores de crescimento EGF, TGF- α e EGFr. Próstatas originadas de 29 cães, com pesos variando entre 6 a 40 kg, foram retiradas, lavadas e pesadas e o volume medido, os valores variaram em 3,8 a 130 g e 2,4 a 90 cm³ respectivamente. Dos fragmentos avaliados 55,17% apresentaram diagnóstico de HPB-ep e 5,75% apresentaram diagnóstico normal. Exames de IHQ foram realizados e para a proteína *CYR61* houve uma forte imunorreatividade nas FML, MLA e núcleo das células epiteliais dos fragmentos avaliados. Houve diferenças estatísticas entre grupos de HPB quanto a fração da área de marcação, no exame de W.B. a proteína teve como peso molecular médio 37,72 kDa. Quanto ao EGF houve uma predominância de marcação na FML e núcleo das células epiteliais, os pesos moleculares médio deste fator de crescimento foi de 47,03 e 41,65 kDa nos fragmentos prostáticos avaliados. O TGF- α teve imunorreatividade nas FML e citoplasma das células epiteliais, e no exame de W.B. houve 2 bandas de pesos moleculares médios de 52,23 e 38,88 kDa. O receptor de membrana EGFr apresentou imunorreatividade nas FML e núcleo das células epiteliais, no W.B. houve apenas uma banda visível de peso molecular médio de 48,49 kDa. A proteína p-ERK1/2 esteve predominante nas FML e núcleo das células e no W.B. apresentou 3 bandas de pesos moleculares médios de 42,61; 39,56 e 37,26 kDa. Houve correlação positiva entre as proteínas e os fatores de crescimento.

Palavras chave: fator de crescimento, hiperplasia prostática benigna, displasias, imunoistoquímica, western blotting

TRANSDUCTION SIGNAL MECHANISM IN CANINE PROSTATE GLAND: EVALUATION IN THE p-ERK1/2 AND *CYR61* PATHWAY

ABSTRACT

The canine prostate gland enlargement also aging could be resulting of excessive stroma and acinar epithelium proliferation, reduced apoptosis, among other. These cellular mechanisms are mediated by hormones, growth factors and proteins, like the proteins *CYR61* and p-ERK1/2 and the growth factors EGF, TGF- α e EGFr. Prostate from 29 dogs, weighing 6 to 40 kg, were collected, washed, weighed and volume was measured, with average from 3,8 to 130 g and 2,4 to 90 cm³ respectively. Approximately 55,17% of samples were diagnosed with HPB-ep and 5,75% were normal. IHQ exams were accomplished and high *CYR61* immunoreactivity in SMF, ASM and epithelial cells nucleus was observed. There were statistical differences between BHP groups related to immunoreactivity area, by means of W. B. and the mean molecular weight was 37,72 kDa. By analyzing EGF, immunoreactivity in SMF epithelial cells nucleus was prevalent, the mean molecular weights was 47,03 41,65 kDa. TGF- α presented immunoreactivity in SMF and epithelial cells cytoplasm and W.B. showed two bands with mean weight 52,23 and 38,88 kDa. The EGFr membrane receptor presented immunoreactivity in SMF and epithelial cells nucleus, W.B. showed only one visible band with mean molecular weight 48,49 kDa. The p-ERK1/2 protein was prevalent in SMF and cell nucleus, W.B. showed three bands with mean molecular weights 42, 61; 39,56 and 37,26 kDa. There was positive correlation between proteins and growth factors.

Key-words: growth factor, benign prostate hyperplasia, PIN, immunohistochemistry, immunoblotting

1 INTRODUÇÃO

Desde que se iniciou a domesticação de nossos animais de produção, a relação entre o tratador e os animais tem sido muito próxima. Durante séculos, esta relação é simbiótica. Por exemplo, os bovinos dependem do homem para fornecer abrigo, nutrição e cuidados gerais, enquanto que o homem beneficia-se do leite, do esterco para combustível ou adubo, e produção de calor (ENGLISH et al., 1992).

No caso de animais de estimação ou de companhia essa relação é ainda mais estreita, pois está envolvido o fator sentimental ou afetivo. Essa relação de afeto existe entre as duas partes e sabe-se que não tem valor financeiro estimado. Nos últimos 25 anos, numerosos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos da presença de um animal de companhia na saúde mental e física do ser humano. Por isso esses animais estão sendo empregados como terapia complementar no tratamento de pessoas com alguma deficiência física ou mental, essa nova modalidade terapêutica está fazendo com que ocorra um incremento da população de animais de companhia, seja por aumento de número ou sobrevida, principalmente em países industrializados por ações favoráveis no âmbito nutricional e sanitário dos animais que em conjunto formam parte de seu bem estar.

Devido a esse aumento da sobrevida, algumas enfermidades que geralmente se manifestam em cães idosos aumentaram sua frequência em centros clínicos veterinários, dentre elas, as alterações prostáticas tem merecido especial destaque.

As doenças prostáticas são comuns em cães idosos. Com o envelhecimento, esta glândula aumenta de volume e peso, usualmente devido à hiperplasia ou transformação neoplásica (BARSANTI & FINCO, 1989). Entre as principais alterações que afetam a próstata se encontram: a prostatite (que somam 60% das alterações), Hiperplasias Prostáticas Benignas (HPB) (40%), Neoplasia Prostática Intraepitelial (PIN) (8%) e neoplasias (2%) (OLIVEIRA et al., 2007).

Acredita-se que a maioria das enfermidades que cursam com alterações morfológicas ocorra por modificações em alguma fase do ciclo celular (PERALTA-ZARAGOZA et al., 1997), que é estimulado e regulado por transduções de sinais entre

receptores, mensageiros e efetores. Os receptores são proteínas de membrana capazes de se ligar a um transmissor (fator de crescimento, hormônios, entre outros) na parte extracelular e permitir a modificação de algum componente intracelular, ou seja, os receptores são os pontos de entrada da informação na célula. A função dos mensageiros intracelulares é transmitir o sinal do receptor da membrana a diversas proteínas, que farão com que um determinado sinal possa ser sentido pela célula. Os efetores são os componentes que produzem o efeito final na célula, que freqüentemente são fosforilações quando se trata de proteínas quinases (LENZ, 2000).

Segundo MASSAGUÉ (1987) a proliferação, diferenciação e organização das células dos tecidos animais são controladas por diversas formas de comunicação intercelular. Uma delas envolve uma rede de polipeptídios, como por exemplo, fatores de crescimento, que ativam receptores de membrana para transdução de sinais de proliferação e diferenciação. Outra forma envolve uma quantidade de moléculas de aderência ancoradas na membrana celular ou depositadas na matriz extracelular (MEC).

Durante o processo de transformação das células normais em células neoplásicas, ocorrem várias alterações genéticas. Neste processo, ocorre a perda do controle dos mecanismos de replicação e reparação do DNA, assim como a segregação do material genético. Ainda que as células normais tenham estratégias de defesa contra o desenvolvimento de tumor, as células tumorais ativam diferentes vias de escape que permitem a progressão da neoplasia (PERALTA-ZARAGOZA et al., 1997).

Dessa maneira, padronizar novas técnicas de diagnóstico precoce das enfermidades prostáticas de cães utilizando pesquisas de proteínas envolvidas no desenvolvimento de alterações teciduais é uma importante alternativa para a melhor compreensão do processo e descobrimento de formas adequadas de tratamento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Descrições anatômica, histológica e funcional da próstata canina

A próstata é a única glândula sexual acessória do cão. É um órgão bilobulado, com septo mediano na superfície dorsal. Está localizada no espaço interperitoneal, caudal à bexiga e à uretra proximal, podendo variar de posição no abdome dependendo da idade do animal, distensão da bexiga e presença de enfermidades prostáticas (BARSANTI & FINCO, 1989; DORFMAN & BARSANTI, 1995). Dorsalmente à glândula está o reto e em sua região ventral a sínfise pubiana e parede abdominal. A próstata é recoberta por uma cápsula de tecido fibromuscular (ROGERS et al., 1986).

Histologicamente, a glândula prostática é composta por ácinos glandulares sustentados por estroma de tecido conjuntivo e musculatura lisa, envolta por uma espessa cápsula fibromuscular. As células epiteliais prostáticas são de dois tipos: a) um epitélio secretor colunar alto, que pode se projetar em forma de papilas para o interior da glândula, e b) epitélio basal, situado rente à membrana basal. O papel dessas células é desconhecido, mas podem ser precursoras de células secretoras. O estroma predomina em animais pré-púberes e, após a maturidade sexual do animal, o componente epitelial é mais abundante (BARSANTI & FINCO, 1989).

A glândula prostática é responsável pela produção do fluído prostático para o transporte e sustentação nutricional dos espermatozóides na ejaculação (BARSANTI & FINCO, 1989; DORFMAN & BARSANTI, 1995). Outras funções desta glândula incluem: participar no controle do fluxo urinário da bexiga, devido ao volume de musculatura lisa; contribuir como glândula exócrina para o plasma seminal com moléculas e enzimas como a fibrinolisina, coagulase e outras, que facilitam a fertilidade; reduzir a acidez da uretra e aumentar a motilidade do espermatozóide por meio do fluído prostático; hidrolisar a fosforilcolina em colina, envolvida na nutrição dos espermatozóides, através da fosfatase ácida prostática; auxiliar como glândula endócrina no rápido metabolismo da testosterona em diidrotestosterona (DHT), influenciando nas funções do hipotálamo e hipófise; e, na espécie humana, os altos níveis de zinco observados no plasma seminal,

parecem ser de origem prostática e possuem ação antimicrobiana (KUMAR & MAJUMDER, 1995).

Com o avançar da idade, a próstata aumenta de volume e peso concomitantemente, com a maturação sexual e elevação da testosterona sérica. Após a maturidade sexual, permanece neste tamanho até o desenvolvimento da hiperplasia prostática benigna (HPB) (BARSANTI & FINCO, 1989). Esta glândula passa então, a apresentar localização abdominal com seu aumento de tamanho relacionado à idade (CHEW, 1997).

2.2 Doenças prostáticas no cão

A próstata é o sítio da maioria das doenças do trato reprodutor masculino, principalmente em cães de meia idade. Devido à alta incidência de enfermidades nesta glândula, os caninos devem ser sempre submetidos ao exame da próstata (PURSWELL et al., 2000).

Dobermann e Pastor Alemão são as raças mais acometidas por enfermidades prostáticas (KAY et al., 1989; CHEW, 1997). GORMAN (1996) citou como as mais freqüentes alterações prostáticas a HPB, a metaplasia escamosa, as prostatites bacterianas, os abscessos, os cistos e as neoplasias. A HPB é a desordem prostática mais freqüente, seguida de prostatite e neoplasias, segundo CHEW (1997). Porém em estudo realizado por OLIVEIRA et al. (2007) a prostatite foi a desordem mais freqüentemente encontrada.

O Quadro 1 representa os sinais clínicos associados a cada uma das doenças prostáticas, segundo DORFMAN & BARSANTI (1995).

A próstata do cão é um dos melhores modelos naturais para doenças deste órgão em humanos, havendo similaridades tanto no desenvolvimento espontâneo das HPBs com o avanço da idade, como nas neoplasias (MCENTEE et al., 1987; LOWSETH et al., 1990; KARR et al., 1995).

Quadro 1 - Sinais clínicos associados com as doenças prostáticas no cão.

Tenesmo	Disúria	Descarga Uretral	Febre, depressão, dor
Hiperplasia	-----	Prost. bacteriana	Prost. bacteriana
Cistos	Cistos	Cistos	-----
Abscesso	Abscesso	Abscesso	Abscesso
Neoplasia	Neoplasia	Neoplasia	Neoplasia

2.2.1 Prostatite

Prostatite é um termo que se utiliza para definir um processo infeccioso e/ou inflamatório da glândula prostática (MARTINS et al., 2000). Acredita-se que a maioria das infecções é causada por bactérias que atingem a próstata por via ascendente, embora também possa ocorrer por via hematógena (KAY, 2003). Os patógenos mais comuns são *E. coli*, *Staphylococcus sp*, *P. mirabilis*, *Streptococcus* e *Mycoplasma*. Os isolados menos comuns incluem *Klebsiella*, *Brucella canis*, *Pseudomonas* e *Ureaplasma*. Infecções anaeróbias são raras e infecções micóticas disseminadas podem causar prostatite (MARTINS et al., 2000).

A prostatite é o principal transtorno prostático que afeta a fecundidade, por provocar deteriorização dos espermatozóides, diminuição da libido, dor e disseminação da infecção para epidídimo e testículos e a análise do sêmen é parte integral da avaliação de possível infecundidade ou subfecundidade do cão. Este estudo está indicado em cães com suspeita de prostatite, orquite ou epididimites. (FELDMAN & NELSON, 1996).

Os sinais clínicos mais comuns em uma prostatite são dor, febre, letargia, hematúria, dificuldade de locomoção e infertilidade. O tratamento da prostatite, bem como abscesso prostático, pode ir desde a castração, administração de antibióticos que tenham penetração na cápsula prostática como, por exemplo, o cloranfenicol, a associação sulfa+ trimetoprim (tem que considerar que as sulfonamidas promovem aplasia de medula e ceratoconjuntivite seca) e a enrofloxacin, seja que tipo de antibiotico instituído geralmente se administra por várias semanas. Outra terapia que

pode ser associada ao antibiótico é a utilização de medicamentos que diminuem o tamanho da glândula, como por exemplo, a finasterida (KUSTRITZ, 2006).

2.2.2 Hiperplasia prostática benigna

A HPB se desenvolve de forma espontânea na próstata, geralmente tem maior incidência em cães de idade avançada (BAMBERG-THALÉN & LINDE-FORSBERG, 1992). Pode ser dividida em estromal, epitelial/cística e atualmente complexo hiperplasia prostática para a denominação do achado de diferentes classificações de hiperplasias na mesma glândula.

Entre os agentes que causam a HPB podem ser citados:

- a testosterona, metabolizada em diidrotestosterona que ativa a proliferação celular (COTRAN et al., 1999) por ligação a receptores androgênicos específicos, presentes nos núcleos das células (KLAUSNER et al., 1994);
- fatores de crescimento; hormônios do complexo pituitária-hipotalâmico; presença de células inflamatórias, do tipo linfo-plasmocitária, no estroma, já que os linfócitos liberam fatores que estimulam a formação de matriz, pela síntese de colágeno, além de promoverem a proliferação de células epiteliais e estromais, pela secreção de IL-6 e IL-7 (Interleucinas 6 e 7), além de exercer efeitos indiretos na promoção de neovascularização, já que liberam fator de crescimento endotelial vascular (LEE et al., 1997);
- diminuição da taxa de apoptose (KLAUSNER et al., 1994);
- desequilíbrio entre morte e proliferação celular (ZIADA et al., 1999).

Apesar de ser considerada uma alteração comum em cães idosos, em alguns animais essa condição está associada a problemas urinários, dor e anormalidades para defecar (BAMBERG-THALÉN & LINDE-FORSBERG, 1992). Os tratamentos da HPB vão desde castração, retirando assim a fonte de testosterona impedindo a sua metabolização até o DHT que é o principal responsável pelo aumento de volume prostático, até a administração de estrógenos, progestágenos, inibidores da 5 α -redutase (KUSTRITZ, 2006) e agonistas de GnRH (PÁRAMA-RAMÍREZ, 2005).

2.2.3 Neoplasia prostática intraepitelial

A Neoplasia Prostática Intraepitelial (PIN) é a lesão precursora dos carcinomas prostáticos. São compostas por focos únicos ou múltiplos de proliferação intra acinar com anaplasia nuclear, porém, não há invasão da membrana basal e foram observadas em 66% dos casos de neoplasia espontânea em próstata de cães. A PIN tem crescimento lento, pode invadir a membrana basal, então se diagnostica como câncer. O diagnóstico precoce da PIN é importante, pois o desenvolvimento do carcinoma pode levar anos, o que permitiria a utilização de terapias que possam evitar a progressão até a neoplasia (WATERS & BOSTWICK, 1997). O tratamento ideal para essa lesão é a prostatectomia, associada à castração do animal (KUSTRITZ, 2006).

2.2.4 Neoplasias prostáticas

As neoplasias prostáticas acometem cães entre oito e dez anos de idade, sem haver predisposição racial, e causam aumento de volume glandular, que à palpação retal apresenta-se firme e irregular com perda total ou parcial da rafe mediana (LEAV & LING, 1968).

O adenocarcinoma é o tipo de neoplasia mais frequente da glândula prostática do cão, essa neoplasia mostra-se bem diferenciada, com glândulas aumentadas de volume e padrão papilar. Os núcleos são grandes e vacuolizados com um ou mais nucléolos evidentes. Há variações no tamanho e forma nuclear, mas o pleomorfismo não é acentuado e as figuras de mitose são raras. Os ácinos apresentam-se próximos uns aos outros, com pouco estroma entre eles (KOZLOWSKY, 1999; COTRAN et al., 1999).

O tratamento das neoplasias prostáticas é paliativo e inclui prostatectomia, castração, quimioterapia e acompanhamento radiográfico em busca de prováveis metástases (KUSTRITZ, 2006).

2.3 CYR61

A proteína *CYR61* (CCN1) faz parte da família das CCN – Fator de Crescimento de Tecido Conectivo (CTGF), Proteína Rica em Cisteína (*CYR61*), e Gene da superexpressão do Nefroblastoma (Nov) - que é constituída por seis proteínas que participam na proliferação celular, migração, formação de tecido de cicatrização e fibrose, diferenciação celular e angiogênese, entre outros (BRIGSTOCK, 2003).

A *CYR61* está bem caracterizada como ligante de integrinas (BABIC et al., 1999; JEDSADAYANMATA et al., 1999). Apresenta-se em níveis baixos nas células em repouso, mas são rapidamente induzidas em resposta a fatores de crescimento (SIMMONS et al., 1989; O'BRIEN et al., 1990), divisão celular (O'BRIEN et al., 1990), em resposta ao estrógeno no tecido uterino (RIVERA-GONZALEZ et al., 1998), pela vitamina D3 nos osteoblastos fetais (SCHUTZE et al., 1998) e pelo fator VII-a e trombina nos fibroblastos humanos (PENDURTHI et al., 2000). No desenvolvimento embrionário, a expressão da *CYR61* é elevada em locais de neovascularização e condensação mesenquimal (O'BRIEN & LAU, 1992) o que confirma seu papel na angiogênese e condrogênese (KIREEVA et al., 1996; BABIC et al., 1998; BABIC et al., 1999).

A *CYR61* é uma proteína ligante da heparina (KIREEVA et al., 1996) e se acumula após ser secretada na matriz extracelular, onde permanece estável e pode ser detectada após as células entrarem em repouso (YANG & LAU, 1991; KIREEVA et al., 1997). Em contraste, a *CYR61*, associada com a superfície celular é rapidamente degradada por um mecanismo desconhecido (YANG & LAU, 1991).

A proteína *CYR61* também foi observada em todas as partes do cérebro de adultos, e em resposta a estimulação dos receptores muscarínicos de acetilcolina nas células HEK293 (NAUS et al., 2000), correspondentemente foi encontrada durante a diferenciação neuronal das linhagens de células do hipocampo (CHUNG & AHN, 1998).

Entretanto, em pesquisas recentes, ficou comprovada uma ativação exacerbada da proteína *CYR61* em diversas enfermidades, dentre elas a arteriosclerose (HILFIKER et al., 2002; SCHOBER et al., 2002), trombose (PENDURTHI et al., 2000) e

especialmente câncer de mama (SAMPATH et al., 2001; XIE et al., 2001; MENENDEZ et al., 2003). Mais recentemente foi relatado o papel importante da proteína no desenvolvimento de alterações prostáticas, principalmente a HPB (SAKAMOTO et al., 2003).

2.4 Família do Fator de Crescimento Epidérmico

Fatores de crescimento são definidos como um diversificado grupo de polipeptídios que tem como principal função modificar a proliferação celular. Atualmente constituem um grupo diferenciado em endocrinologia, pois a biologia desses fatores difere da clássica biologia hormonal, onde seus locais de síntese e ação não são limitados a determinados tecidos. Muitos fatores de crescimento provavelmente funcionam de modo parácrino e em certos casos, a sua ação pode ser de natureza autócrina. A difusão dos locais de síntese e localização das diversas células alvo limita em quantidades, a purificação do material disponível para a realização de estudos com animais vivos, restringindo o progresso de compreensão das funções fisiológicas normais de muitos fatores de crescimento envolvidos no crescimento e desenvolvimento (CARPENTER & COHEN, 1990).

O “Epidermal Growth Factor” (EGF) ou Fator de Crescimento Epidérmico foi o primeiro fator de crescimento descoberto. Foi isolado da glândula submaxilar de ratos em 1962 por COHEN (1962). Desde então, estudos com o referido fator de crescimento, proporcionam várias pesquisas a respeito de eventos celulares e moleculares que são subjacentes á efeitos biológicos de uma série de fatores de crescimento e hormônios.

A família do EGF tem sido objeto de muitos estudos, já que além de regular processos como multiplicação e diferenciação, se encontram implicado em numerosos processos patológicos como o câncer, processos degenerativos, entre outros (AARONSON, 1991). A família é composta pelo Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), Fator de Crescimento de Transformante-Alpha (TGF- α), a anfiregulina, o fator de crescimento semelhante ao EGF ligado a Heparina (HB-EGF), a Beta-celulina (β -TC) e

a epiregulina (EPR). Todos eles atuam sobre o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFr ou ErbB1) (CARPENTER & COHEN, 1979, 1990; MASSAGUÉ, 1987; MASSAGUÉ & PANDIELLA, 1993; GROENEN et al., 1994; TOYODA et al., 1995; BOONSTRA et al., 1995).

Todos os membros da família EGF são proteínas que possuem seis cisteínas, que formam três pontes de dissulfeto. Estas pontes são essenciais para manter sua estrutura terciária e para exercer seus efeitos biológicos. Em ocasiões, podem viajar pelo sangue constituindo dímeros, o que permite prolongar sua vida média e atuar de forma endócrina (MASSAGUÉ, 1987; MASSAGUÉ & PANDIELLA, 1993).

2.4.1 Fator de Crescimento Epidérmico

O EGF, também conhecido por urogastrona, é um fator de progressão que estimula a divisão celular por se ligar a receptores específicos de tirosinoquinase na membrana da célula. Foi descoberto inicialmente por sua capacidade em causar erupção precoce de dentes, e está amplamente distribuído nas secreções e líquidos tissulares como saliva, urina e conteúdos intestinais (COTRAN et al., 1999).

Esse fator de crescimento possui um importante papel na regulação da proliferação tanto de células normais quanto células neoplásicas (SHRESTHA et al., 1992). A presença do EGF é essencial para a indução da mitose. Além do mais, reduz o contato célula-célula, o que comprova sua habilidade em promover a motilidade de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais (BOULOUGOURIS & ELDER, 2001).

2.4.2 Fator de Crescimento Transformante- α (TGF- α)

O “Transforming Growth Factor-Alpha” (TGF- α) ou Fator de Crescimento Transformante-Alpha é um polipeptídeo de 50 aminoácidos que foi extraído inicialmente de células transformadas pelo vírus do sarcoma e por esse motivo foi considerado seu envolvimento na transformação de células normais em cancerosas (KUMAR et al., 1995; COTRAN et al., 1999). Ele é estrutural e funcionalmente similar ao EGF em 40 e

50%, respectivamente, e acredita-se que, por isso, eles atuam no mesmo receptor o “Epidermal Growth Factor Receptor” (EGFr), induzindo efeitos biológicos similares (SCHREIBER, 1988; SCHLESSINGER, 1988).

O TGF- α ativo e solúvel é processado a partir de um precursor transmembrana, o pró-TGF- α . Essa molécula é formada por um domínio extracelular aminoterminal e está ancorado no plasma a partir de uma porção hidrofóbica aminoácida intermediária, possuindo ainda uma porção citoplasmática C-terminal (KUMAR et al., 1995).

O pró-TGF- α passa por uma clivagem endoproteolítica sequencial para que haja a liberação da forma ativa do fator. A forma transmembrana também é biologicamente ativa e pode interagir com o receptor EGFr em células adjacentes. Existe ainda uma forma mais agressiva desse fator transmembrana, o pró-TGF- α que sofreu apenas clivagem em sua porção N-terminal, e que foi detectado na membrana plasmática em certas linhas de células tumorais. Esse precursor apresenta uma capacidade aumentada de ativar EGFr e isso vem sendo associado com maior crescimento em alguns tumores (MULET et al., 2006).

O TGF- α é encontrado em embriões em desenvolvimento e em vários tecidos normais adultos. Em muitos casos, sua distribuição está associada ao EGFr, o que conduziu à idéia de que o TGF- α é um regulador autócrino e parácrino do crescimento normal do desenvolvimento. Também foi relacionado à cicatrização e homeostase em tecidos como pele, glândulas mamárias, fígado e rins. Na cicatrização, em especial, o TGF- α é produzido por macrófagos ativos e eosinófilos, sugerindo uma função imunológica no processo, onde o TGF- α e o VEGF intensificam a ativação e liberação de fibroblastos. Em queratinócitos, o TGF- α promove migração celular e proliferação (KUMAR et al., 1995; HINKLE et al., 2003).

Além de sua função na formação, manutenção e reparação tecidual, tem sido relacionada à progressão, invasão e metástase de uma série de neoplasias, tanto pelo suprimento sanguíneo, devido ao potencial angiogênico que promove a vascularização do tumor, quanto pela proliferação celular e depósito de matriz extracelular (WELLS, 1999; BOULOUGOURIS & ELDER, 2001).

Sugere-se que o TGF- α também esteja envolvido com a iniciação da proliferação vascular através da mediação de outros fatores angiogênicos, tais como o “Vascular Endothelial Growth Factor” (VEGF) ou Fator de crescimento do endotélio vascular. Assim, o TGF- α induziria fortemente a síntese de VEGF em queratinócitos, exercendo um papel significativo na iniciação e na manutenção da permeabilidade vascular aumentada e proliferação (SOARES et al., 2000). Segundo BOULOUGOURIS & ELDER (2001) e MULET et al. (2006), o TGF- α é um fator angiogênico mais potente que EGF.

2.5 Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFr)

O receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFr) é uma glicoproteína membro da família ErbB de receptores tirosinoquinases, por esse motivo também conhecido por ErbB1 ou HER1 (SOARES et al., 2000). Em outras palavras, esse receptor é uma proteína transmembrana que possui atividade intrínseca de ativação fosfotransferase (EL-RAYES & LORUSSO, 2004).

A porção extracelular do EGFr possui uma porção amino-terminal que funciona como sítio de reconhecimento para determinados fatores de crescimento. Uma região hidrofóbica que representa o segmento transmembrana, e sua estrutura intracelular pode ser alinhada a proteínas tirosinoquinases e à subunidade catalítica das quinases dependentes do cAMP (AMP cíclico). A ligação de moléculas a esse receptor é específica e de alta afinidade (BOULOUGOURIS & ELDER, 2001).

O EGFr pode se ligar e ser ativado por alguns fatores de crescimento, codificados por vírus, entre outros (SHRESTHA et al., 1992; BOULOUGOURIS & ELDER, 2001; EL-RAYES & LORUSSO, 2004). EGF e TGF- α contêm vários tipos de aminoácidos que possuem um papel importante em sua ligação com o receptor. A estimulação exercida por um desses ligantes pode promover replicação de DNA seguida por divisão celular. Esse sistema parece ser uma das influências mais importantes no crescimento de células epiteliais e de outros tipos (BOULOUGOURIS & ELDER, 2001).

A ativação do EGFr leva à proliferação celular, o que pode explicar como a presença desse receptor em tumores pode contribuir para o seu crescimento (BOULOUGOURIS & ELDER, 2001; EL-RAYES & LORUSSO, 2004).

A função de EGFr está desregulada em várias desordens malignas, nas quais podemos encontrar super expressão do receptor (YAMADA et al., 1989; VERED et al., 2003; MULET et al., 2006; EL-RAYES & LORUSSO, 2004), mutação do receptor que resulta em ativação independente de ligante e ativação autócrina a partir de superprodução dos ligantes (BOULOUGOURIS & ELDER, 2001; EL-RAYES & LORUSSO, 2004). Nesses tumores, o EGFr está envolvido na transformação maligna e no crescimento tumoral, a partir da inibição da apoptose, proliferação celular, promoção de angiogênese e metástase (EL-RAYES & LORUSSO, 2004).

É importante ressaltar que, para que possa gerar proliferação exagerada, a expressão de EGFr deve ser acompanhada da presença de ligantes ativos, já que o surgimento de um fenótipo maligno depende da exposição das células a altas concentrações de EGF. A hiperproliferação também pode estar relacionada a uma alteração do meio que promova a apresentação do receptor a fluidos secretórios contendo EGF, implicando em sinalização e proliferação inesperada (BOULOUGOURIS & ELDER, 2001).

Em relação à angiogênese, o EGFr presente em células endoteliais pode participar indiretamente do crescimento tumoral, sinalizando a proliferação do endotélio vascular (YAMADA et al., 1989).

BOULOUGOURIS & ELDER (2001) verificaram, em seus estudos, que carcinomas mamários que exibiam EGFr em suas células normalmente eram os que mais se disseminavam. Este fato pode estar relacionado ao aumento da produção de proteases que degradam a MEC através desse receptor, e às alterações que sua ativação promove na adesão e motilidade celulares.

2.6 Proteína quinase mitógeno – ativada (MAPK) e sua via de transdução de sinal

Para ARAÚJO et al. (2001) dentre as proteínas quinases existem as Proteínas quinases mitógeno – ativada (MAPK), que constituem um módulo de três quinases, formam um sistema regulatório que estabelece uma via seqüencial de ativação de proteínas quinases.

O primeiro componente do módulo é a MAP quinase quinase (MAPKKK, c-Raf-1). Que pode ser ativada tanto por fosforilação quanto por interação com uma proteína de ligação GTP da família Ras ou Rho. As MAPKKK são quinases serina/treonina que, quando ativadas, fosforilam e ativam a próxima quinase no módulo, a MAP quinase quinase (MAPKK). As MAPKK são quinases que reconhecem e fosforilam um motivo Thr-X-Tyr na alça de ativação da MAPK, o que define as MAPKK como sendo quinases de dupla especificidade. As MAPKs constituem a quinase final no módulo de ativação e fosforilam seus substratos em resíduos de serina e treonina; a grande maioria dos substratos das MAPK são fatores de transcrição. As MAPKs podem ser categorizadas em 5 sub-famílias: MAPK-ERK 1/2, MAPK-p38, MAPK-jnk, MAPK-ERK 5 e as MAPK ERK 3/4. As MAPK nomeiam a via de transdução de sinal onde são empregadas (isto é, via da ERK 1/2, via da MAPKp38, etc).

Segundo LENZ (2000), as MAPKs estão envolvidas em diversos eventos celulares, entre os quais podem ser destacados:

Proliferação celular: o mecanismo parece envolver expressão da ciclina D1 e a repressão do inibidor de ciclo celular p27 Kip mediada pela ERK (LAVOIE et al., 1996; KERKHOFF & RAPP, 1998). As MAPKs também estão envolvidas na sinalização que inibe a proliferação celular, sendo que a ativação da p38 e atividades muito elevadas da cRaf-1 (e provavelmente ERK) aumentam a expressão de proteínas inibidoras do ciclo celular como p21 cip1 (LAVOIE et al., 1996; SEWING et al., 1997; KERKHOFF & RAPP, 1998).

Apoptose: a ativação da JNK induz apoptose, enquanto que a ativação da ERK bloqueia o processo apoptótico em linhagens feocromocitoma (“pheochromocytoma cells” - PC12) (XIA et al., 1995), o que foi confirmado pelo efeito supressor da ativação

da ERK por “Fibroblastic Growth Factor 2” (FGF-2) da apoptose induzida por fator de necrose tumoral α (“Tumor Necrosis Factor α ” - TNF α) (GARDNER & JOHNSON, 1996). A p38 também parece ser uma das responsáveis pela apoptose induzida pela retirada de fatores de crescimento (KUMMER et al., 1997).

Transcrição de genes: vários fatores de transcrição podem ser regulados pelas MAPKs, como a proteína de ligação ao elemento regulado por cAMP (“regulated element binding protein” - CREB – cAMP), através de uma quinase ativada pela ERK denominada Rsk2 (XING et al., 1996). ERK e JNK podem fosforilar diretamente a Elk1, podendo levar à indução da expressão da c-fos, integrando desta forma os sinais destas duas cascatas (KARIN, 1996 e WHITMARSH et al., 1998). JNK também pode fosforilar e ativar c-jun, que forma, juntamente com c-fos, o ativador transcripcional AP1 (GUPTA et al., 1995).

Integração de sinais: as MAPK, por serem ativadas pelos mais diversos mecanismos de transdução de sinal, são importantes integradoras de sinal, como por exemplo, a mediação de muitos efeitos do Ca²⁺ em neurônios (FINKBEINER & GREENBERG, 1996).

Diferenciação celular: ativações com cinéticas de desativação lenta podem induzir diferenciação em PC12 (MARSHALL, 1995 e 1998) e megacariócitos (RACKE et al., 1997).

Plasticidade neuronal: Tanto estudos com deleção de genes (“knockout” - KO) bem como utilizando inibidores mostraram o envolvimento das MAPKs em eventos de plasticidade como potenciação de longa duração (“long-term potentiation” - LTP) e memória (IMPEY et al., 1999 e WALZ et al., 1994).

As MAPKs são formadas por três famílias de quinase, MAPK, MAPKK e MAPKKK. Embora várias quinases possam regular as MAPKKK e inúmeras outras possam ser reguladas pelas MAPKs, produzindo cascatas de cinco ou mais quinases, estes três níveis de quinases são conhecidos como cascata das MAPKs. Em cada um dos níveis existem vários subtipos, sendo que três cascatas razoavelmente independentes têm sido denominadas ERK, c-jun quinase (“c-Jun Kinase” - JNK) e p38 (WIDMANN et al., 1999).

ROYUELA et al. (2002), MALIK et al. (2002), UZGARE et al. (2003), estudando a expressão da p38MAPK e ERK 1/2 em próstatas normais e alteradas, observaram que em tumores em processo de diferenciação e/ou multiplicação a ativação destas enzimas foi significativamente elevada, enquanto que em tumores bem estabelecidos e em metástases, ocorre diminuição da expressão da p38MAPK e de ERK 1/2.

PAPATSORIS & PAPAVALASSILIOUS (2001) afirmaram que a intensidade de sinalização da MAPK está diretamente implicada com a progressão das alterações prostáticas, porém postulam que efeitos farmacológicos sobre esta sinalização podem criar novos caminhos para o controle clínico-terapêutico dessas alterações.

2.7 Interação entre fatores de crescimento e proteínas

O EGF e/ou TGF- α , ao interagir com o EGFr, ativa vários sistemas de transdução de sinais: a rota das MAP quinases, a da fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K), a da fosfolipase C γ (PLC γ) e do STAT (Transdutor ativador de sinal de transcrição).

Quando o EGF atua sobre o receptor, produz uma troca conformacional e um processo de dimerização no receptor. O EGFr não só pode formar dímeros consigo mesmo, mas também com o ErbB2 e ErbB3. Este processo de dimerização produz a ativação da tirosina quinase como consequência da transfosforilação dos resíduos de tirosina dos extremos C-terminal (SCHLESSINGER, 1988; ULLRICH & SCHLESSINGER, 1990; COUNTAWAY et al., 1990; WEISS & SCHLESSINGER, 1998).

As tirosinas fosforiladas do receptor são reconhecidas por proteínas que possuem extremos SH2 (Shc) (HELDI, 1991; KOCH et al., 1991; MARGOLIS, 1992; VAN DER GEER & PAWSON, 1995). Estas proteínas com domínio SH2 podem ser de dois tipos:

- proteínas adaptadoras, como Grb2 que podem recrutar outras proteínas transdutoras como a Sos;
- enzimas que podem ativar ao serem fosforiladas pelo receptor.

Existem outras proteínas SH2 cuja função ainda se desconhece, mas que possivelmente atuem como reguladoras negativas impedindo que se liguem outras proteínas SH2 às tirosinas fosforiladas.

Quando o EGFr é estimulado, inicia-se a rota das MAP quinases, onde a proteína Ras atua como ligante central permitindo a integração de diferentes sinais (ANDERSON et al., 1990; LOWENSTEIN et al., 1992; ROZAKIS-ADCOCK et al., 1993; QUILIAN et al., 1995)

Semelhante aos fatores de crescimento, a proteína *CYR61* é expressa por meio de fatores de crescimento como o TGF- β , FGF, PDGF e hormônios como 17 β -estradiol, a proteína liga-se à integrinas como a “integrina $\alpha v \beta 3$ ” que inicia a rota de transdução de sinal da MAP quinase como exemplificado na Figura 1.

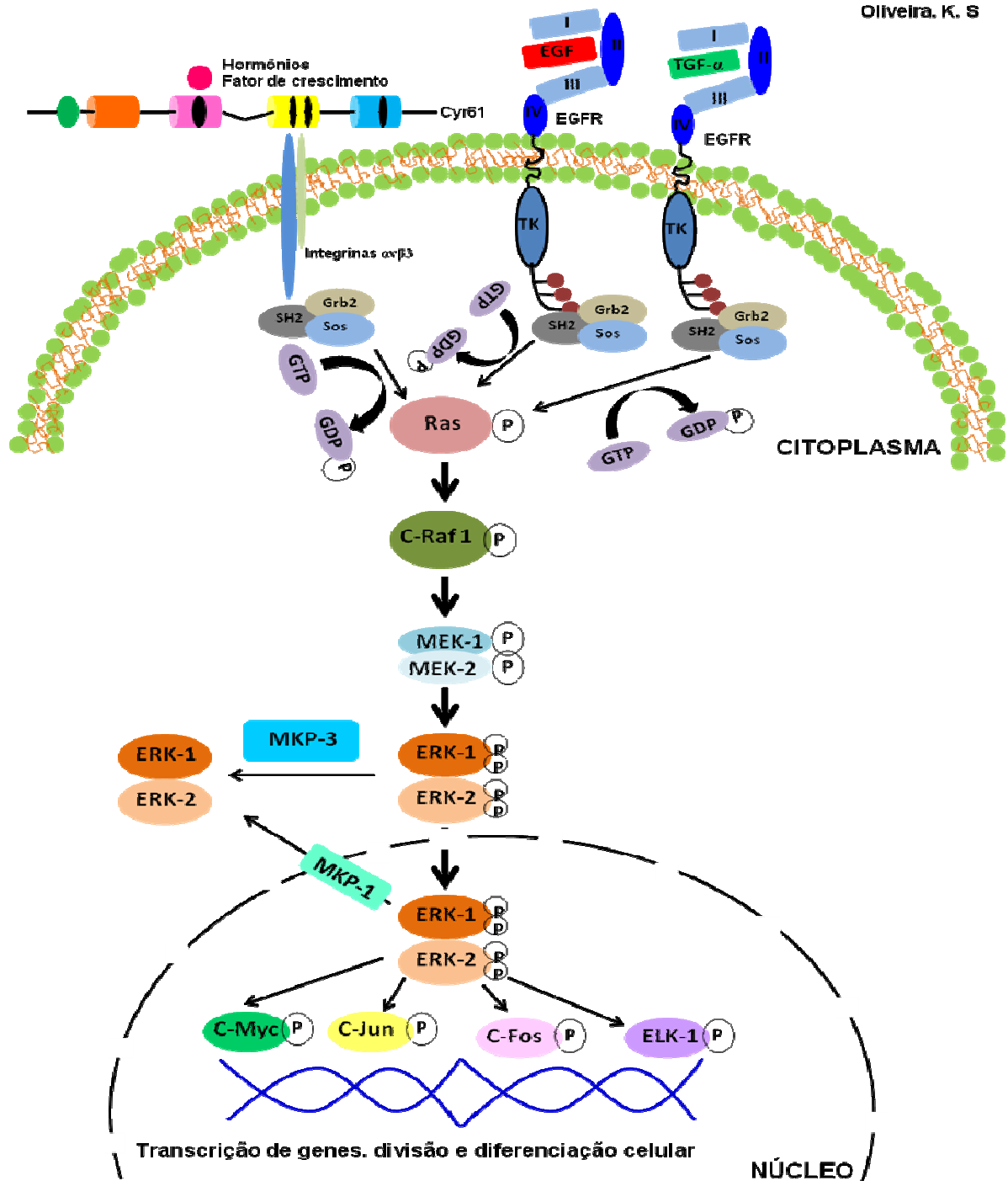


Figura 1– Esquematização proposta para a integração da proteína *CYR61*, dos fatores de crescimento EGF e TGF- α , do receptor EGFR com a rota de transdução de sinal da proteína MAP quinase p-ERK1/2, baseado em LEASK & ABRAHAM, (2006); PEDERSEN & POULSEN, (2006) e ARAÚJO, (2001).

3 OBJETIVOS

1 – Localizar e quantificar, por meio de IHQ, a proteína *CYR61*, os fatores de crescimento EGF, TGF- α , o receptor EGFr e a proteína quinase mitógeno – ativada p-ERK1/2 em próstatas normais e alteradas de cães.

2 – Correlacionar às intensidades encontradas nos grupos, normal e com diferentes graus de HPB, avaliados com as diferentes proteínas estudadas.

3 – Detectar, por meio de “Western blotting”, a proteína *CYR61*, os fatores de crescimento EGF e TGF- α , o receptor EGFr e a MAP quinase p-ERK1/2, bem como seus pesos moleculares aparentes em próstatas normais e alteradas de cães.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Colheita do material

Os cães adultos (n=29) e em sua maioria sem raça definida, doadores das próstatas utilizadas neste estudo, foram provenientes do Centro de Zoonoses da cidade de Sertãozinho-SP. Os animais foram pesados (PC= peso cães), pré-anestesiados com acepromazina 1% (0,055 - 0,11mg/kg IM), e após 20 minutos, anestesiados com cloridrato de xilazina 2% (1,1 mg/kg/EV), passados cinco minutos aplicou-se cetamina (22 mg/kg/IM). Após constatação de que os animais estavam em plano cirúrgico, realizou-se uma incisão na linha média ventral e a próstata foi retirada. Os animais foram sacrificados com sobredosagem de anestésico e posteriormente a pele foi aproximada através de rafia.

A glândula foi lavada com solução salina 0,9%, pesada (PP = peso próstata) e seu volume (VP = volume próstata) medido por meio de imersão em Becker contendo solução salina 0,9% em sua máxima capacidade. O volume transbordado foi mensurado por seringa graduada.

Posteriormente as próstatas foram recortadas em três fragmentos seguindo a estruturação das partes, cranial (A, n=2), medial (B, n=2) e caudal (C, n=2), de acordo com a Figura 2.

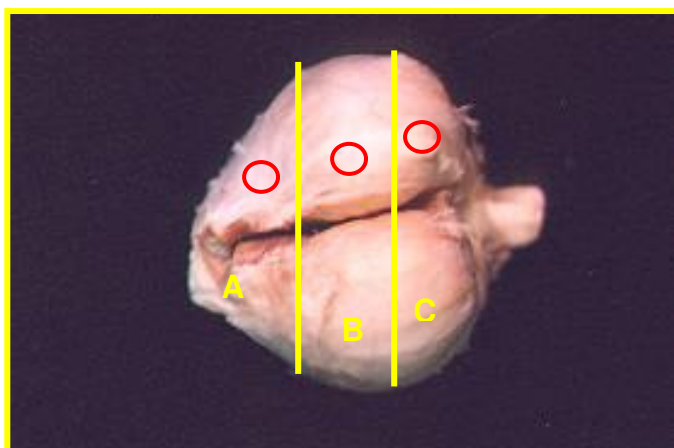


Figura 2- Fotografia de próstata de cão indicando os locais dos cortes efetuados para cada método de conservação. Fonte: LAUFER-AMORIM, 2001

Os três fragmentos prostáticos obtidos de cada glândula foram acondicionados em frascos, identificados de acordo com o número do cão e parte da próstata colhida, contendo solução de formalina 10% tamponado com fosfatos e pH 7.4. Após 12 horas os fragmentos foram recortados em partes menores, colocados em cassetes igualmente identificados e acondicionados em recipiente contendo álcool etílico 70% por 12 horas. Passado esse período, foram processados para a técnica inclusão em parafina, obtidos cortes histológicos de 5 µm e aderidos á lâminas. Posteriormente foram corados pelo HE (Hematoxilina e Eosina) como descrito por LUNA (1968). O procedimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia animal da FCAV/UNESP.

Outras três partes da glândula (circulo vermelho) foram acondicionadas em tubos criogênicos, identificados, e transportados inicialmente em botijão contendo nitrogênio na fase líquida a temperatura de -196°C e posteriormente armazenados em freezer - 80°C no Laboratório de Reprodução Animal da FCAV/UNESP. Antes do processamento para o exame de Western Blotting (W. B.), os tubos com as amostras, foram colocados em um recipiente isotérmico contendo dióxido de carbono (CO₂) solidificados e levados para a Unidade de Proteômica da Faculdade de Farmácia da Universidade Complutense de Madrid-Espanha.

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal - CEBEA da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” por estar de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação – COBEA.

4.2 Diagnóstico Anatomopatológico

O diagnóstico anatomopatológico foi realizado no Serviço de Patologia Veterinária do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP por meio de microscopia óptica e seguiram o padrão descrito por LAUFER- AMORIM, 2001:

- Normal (N): ausência de alteração histológica
- Prostatite (P): presença de infiltrado inflamatório no estroma e/ou luz glandular

- HPB-Epitelial papilífera (HPB-ep): hiperplasia das células epiteliais glandulares sem hipertrofia, levando a uma proliferação papilífera para o lúmen glandular, mantendo a membrana basal intacta.
- HPB-estromal (HPB-e): proliferação do estroma fibroso ou muscular, associado ou não a atrofia glandular e presença de infiltrado inflamatório intersticial mononuclear
- Complexo Hiperplasia Prostática Benigna (CHPB): presença das hiperplasias estromal, epitelial papilífera e epitelial cística em um mesmo fragmento
- Displasia ou PIN: presença de células displásicas no epitélio glandular.
- Neoplasia: presença de células neoplásicas no epitélio glandular.

4.3 Imunoistoquímica (IHQ)

A técnica de IHQ foi fundamentada no princípio do complexo avidina-biotina-peroxidase, descrito por HSU et al. (1981).

Cortes histológicos de próstata humana foram empregados para padronização das diluições de cada anticorpo utilizado.

Os blocos de parafina com os fragmentos, de próstata canina escolhidos, foram seccionados numa espessura de 3µm e os cortes aderidos em lâmina previamente tratada com 3-amino-propyl-triethoxisilane (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os cortes foram desparafinizados com banhos subseqüentes de Xilol PA (3 vezes), álcool nas concentrações: absoluto (2 vezes), 90%, 70% e 50%, seguidos de água destilada. A recuperação antigênica foi realizada por meio de solução tampão de citrato de sódio (pH 6.0) em panela de pressão por 30 minutos. A enzima peróxidase endógena foi neutralizada utilizando peróxido de hidrogênio PA (10 vol., 9%) por 15 minutos. Após cinco lavagens em solução PBS (pH 7.4), as proteínas foram bloqueadas com soro normal de cabra (Vectastain Elite Kit ABC – Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) por uma hora a temperatura ambiente em sistema úmido e fechado.

Os anticorpos utilizados, descritos no Quadro 2, quando adicionados aos cortes foram mantidos por toda noite a temperatura ambiente (variando de - 4 °C a 4°C) em sistema úmido e fechado.

Quadro 2 - Descrição dos clones, procedência, especificidade e diluição dos anticorpos utilizados na IHQ, em tecidos prostáticos caninos.

Anticorpo	Clone/procedência	Especificidade	Diluição utilizada
anti- <i>CYR61</i>	pc, H-78, Santa Cruz, CA, USA	rt, cmg, hu	1/400
anti- EGF	pc, Ab-3, PC08, Calbiochem, CA, USA	hu	1/20
anti- TGF- α	mc, Ab2, GF10, Calbiochem, CA, USA	hu, cmg, rt, ca, hmt	1/20
anti- EGFR	mc, Ab-5, GR15, Calbiochem, CA, USA	hu	1/20
anti-p-ERK1/2	pc, 9101S, Cell Signaling, MA, USA	rt, hu	1/200

Legenda: pc= policlonal, mc= monoclonal, rt= rato, cmg= camundongo, hu= humano, ca= canino, hmt= hamster

Após lavagens, o anticorpo secundário policlonal biotinilado (Vectastain Elite Kit ABC – Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) e o monoclonal (OS02B, Calbiochem, CA, USA) foram adicionados na concentração recomendada pelo fabricante no primeiro caso e 1/200 no segundo caso, e permaneceu nos tecidos por um período de 30 minutos a temperatura ambiente em sistema úmido e fechado. Após lavagem do anticorpo secundário, foi adicionado o complexo Avidina-biotina-peroxidase (Vectastain Elite Kit ABC – Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente em sistema úmido e fechado. A reação foi detectada pela adição do 3,3 “dihydrate diaminobenzidine-tetrahydrochloride” (DAB, Dako Cytomation Carpinteria, CA, USA) aos cortes e a contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris. O controle negativo foi realizado com os mesmos cortes dos fragmentos prostáticos, porém com ausência de adição do anticorpo primário. As lâminas foram montadas com o meio Aquatex (Merck, Darmstadt, Germany). As IHQs foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Complutense de Madrid- Espanha.

Após a classificação final dos 87 fragmentos, 28 destes foram escolhidos para compor os grupos experimentais do exame de IHQ que foram assim distribuídos:

- HPB versus N, onde o número de amostras de cada grupo foi composto por: HPB-e (n=6), HPB-ep (n=6), CHPB (n=6) e N (n=5);
- P versus N, onde os que tinham prostatite somaram dois fragmentos e cinco foram os normais;

- Displasia ou PIN versus N com três fragmentos com dispalsia ou PIN e cinco normais.

Inicialmente os cortes histológicos marcados com os anticorpos policlonais e monoclonais foram avaliados sob microscopia de luz óptica (Olympus BX 50, Câmara Olympus DP 50, Olympus, Hamburg - DE). Foram retiradas fotos de 10 campos diferentes (média ponderada) de cada fragmento de cada grupo de diagnóstico e de cada proteína estudada para avaliar a presença ou ausência de marcação, inicialmente nos diferentes diagnósticos anatomopatológicos e, posteriormente, dentro de cada diagnóstico.

Para realizar as avaliações, cada fragmento foi dividido em componente estromal, onde foram verificadas marcações nas seguintes estruturas:- fibras musculares lisas (FML), fibroblastos (F), musculatura lisa das artérias e/ou arteríolas (MLA), células endoteliais (CE), infiltrado de célula mononuclear (CM); componente epitelial acinar, onde a marcação foi verificada no citoplasma e núcleo das células secretoras.

As fotos também foram utilizadas para avaliação da intensidade e área tingida pelo anticorpo correspondente, por meio do “software Image J” 1.40 (Java Corporation – CA, USA) para os diagnósticos de HPB e normal. Após análise das imagens, os valores numéricos emitidos pelo *software* foram utilizados para a realização dos testes estatísticos.

A avaliação estatística foi realizada por meio do programa SAS e foi utilizado o teste de correlação para avaliar os dados numéricos obtidos entre os diagnósticos normal e HPB, e a proteína estudada.

Todos os procedimentos que necessitaram de microscopia óptica foram realizados nas dependências do Laboratório de Histologia Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Complutense de Madrid-Espanha.

4.4 “Western Blotting” (W. B.)

A técnica de Western Blotting utilizada seguiu o padrão descrito por LAEMMLI (1970) com modificações para o estudo em questão.

As amostras congeladas foram levadas a Unidade de Proteômica da Faculdade de Farmácia da Universidade Complutense de Madrid – Espanha.

Dos fragmentos prostáticos congelados, foi escolhido um fragmento normal, um de cada diagnóstico estudado e um fragmento de útero hígado de cadela. As proteínas estudadas já foram identificadas neste tecido canino (TAMADA et al., 2005).

As amostras foram lisadas mecanicamente com solução de RIPA (anexo) acrescida de inibidores de proteases (Complete, Mini, EDTA-free; Protease Inhibitor Cocktail Tablets, cat#11836170001, ROCHE, IN, USA) e fosfatases (ortovanadato de sódio 100 mM). Foram centrifugadas por 15 minutos a 4°C a 14.000 rpm para obtenção do extrato de proteínas (sobrenadante). A proteína foi quantificada pela técnica colorimétrica de BCA (Ácido Bicíntrico, Pierce, 23225, IL, USA).

Em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% (anexo) foi adicionado 50µg de proteína de cada amostra e o marcador de peso molecular Precision plus protein Standards dual color (Bio-Rad Laboratories Inc, Cat.: 161-0374, CA, USA). A transferência foi realizada para uma membrana de Polivinilidene fluoride (PVDF) numa voltagem de 100 volts por uma hora e as membranas foram coradas com vermelho ponceau.

As membranas foram lavadas por 10 segundos em metanol puro e posteriormente foram lavadas 2 vezes em TBS-T (anexo) 5 minutos cada vez. Adicionado solução de bloqueio (leite desnatado 5%) por uma hora a temperatura ambiente em sistema fechado. Após lavagens com TBS-T, foram adicionadas as diluições dos anticorpos primários, descritos no Quadro 3, em sistema fechado a temperatura ambiente, por 12 horas.

Quadro 3 - Descrição dos clones, procedência, especificidade e diluição dos anticorpos utilizados no W.B., em tecidos prostáticos caninos.

Anticorpo	Clone/procedência	Especificidade	Diluição utilizada
anti- <i>CYR61</i>	pc, H-78, Santa Cruz, CA, USA	rt, cmg, hu	1/3000
anti- EGF	pc, Ab-3, PC08, Calbiochem, CA, USA	hu	1/250
anti- TGF- α	mc, Ab2, GF10, Calbiochem, CA, USA	hu, cmg, rt, ca, hmt	1/200
anti- EGFR	mc, Ab-2, GR02L, Calbiochem, CA, USA	hu	1/100
anti-p-ERK1/2	pc, 9101S, Cell Signaling, MA, USA	rt, hu	1/500

Legenda: pc= policlonal, mc= monoclonal, rt= rato, cmg= camundongo, hu= humano, ca= canino, hmt= hamster

Após lavagem com TBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário policlonal (NA9340v, Amersham Bioscience, NJ, USA) e monoclonal (NA9310v, Amersham Bioscience, NJ, USA) a temperatura ambiente em sistema fechado por duas horas. Após sucessivas lavagens de TBS-T e duas de TBS, as membranas foram colocadas na solução reveladora Super Signal West Pico Chemiluminescente Substrat HRP (Cat#34080, Pierce, MD, USA). Retirado o excesso de solução, as membranas foram expostas ao filme de Raio-X (6468359, Kodak, AM, BR) e reveladas na máquina reveladora de Raio-X (Kodak, X-OMAT 2000 Processor). No Quadro 3 estão descritos as concentrações utilizadas do anticorpo secundário e tempos em que as membranas ficaram expostas na solução reveladora e filme radiográfico.

Quadro 4 - Descrição da diluição do anticorpo secundário e os tempos em que as membranas permaneceram na solução reveladora e filme radiográfico.

Proteína	Diluição Ac secundário	Tempo na solução reveladora	Tempo de exposição no filme radiográfico
anti- <i>CYR61</i>	1/2000	3 min	10 min
anti- EGF	1/2000	3 min	10 min
anti- TGF- α	1/500	5 min	30 min
anti- EGFR	1/500	10 min	30 min
anti-p-ERK1/2	1/2000	5 min	30 min

Legenda: Ac= anticorpo

Os filmes foram escaneados no Laboratório de Sanidade Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Complutense de Madrid, para obtenção dos pesos moleculares (GS 800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad labs, UK) de cada proteína avaliada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação morfológica

Os 29 cães utilizados nesta pesquisa apresentaram PC variando de 6 a 40 kg, o PP variando 3,8 a 130 g e o VP variando de 2,4 a 90 cm³.

Neste estudo não foi possível determinar a idade exata dos animais, já que eram provenientes de centro de controle de zoonoses. Porém, por observação do conjunto dentário dos animais pode-se afirmar que todos tinham idade adulta. Os animais, em sua maioria, eram sem raça definida.

Dos valores dos parâmetros de cada próstata avaliada foram realizadas correlações entre: PC x PP, PC x VP e PP x VP e foi observado que:

1. PC x PP teve coeficiente de correlação de $R=0,57$ ($P\leq 0,01$).
2. PC x VP teve coeficiente de correlação de $R=0,62$ ($P\leq 0,001$).
3. PP x VP apresentou coeficiente de correlação de $R=0,99$ ($P\leq 0,0001$).

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que cães mais pesados possuem próstatas mais pesadas e com maior volume, e próstatas com maior peso correspondem às próstatas com maior volume.

Segundo BARSANTI & FINCO (1986) o desenvolvimento da glândula prostática está relacionado com raça, idade e peso corporal do cão.

De acordo com JOHNSTON et al. (2000) 80% dos cães inteiros com mais de cinco anos de idade apresentam algum tipo de HPB e o volume da glândula dos animais afetados é de 2 a 6,5 vezes maior em relação a animais com mesmo peso com próstatas normais. RUSSEL & WILSON (1994) afirmaram que o desenvolvimento da HBP no cão se dá de forma espontânea a partir do terceiro ano de vida por influência do hormônio DHT, um metabólito da testosterona resultante da ação da enzima 5α – redutase, já que POULET (1985) afirmou que o crescimento normal da próstata é estabilizado por volta de dois anos de idade.

Devido ao número de glândulas com os diagnósticos normais e com diferentes graus de HPB, foi possível realizar estudo estatístico comparando os parâmetros PC,

PP e VP, e os dados estão apresentados na Tabela 1. Os diagnósticos de prostatite e adenocarcinoma apareceram somente uma vez e nenhuma próstata foi considerada em seu total com displasia ou PIN, por isso não foi possível realizar médias dos parâmetros.

Tabela 1 - Médias $\pm$ erro padrão da média para os parâmetros peso cão (PC), peso próstata (PP) e volume próstata (VP) para os animais que apresentaram próstatas normais e com diferentes graus de HPB.

Diagnóstico	Parâmetros		
	PC (kg)	PP (g)	VP (cm ³)
N	14,50 $\pm$ 6,50	15,80 $\pm$ 8,30	14,75 $\pm$ 8,25
HPB-ep	15,38 $\pm$ 2,34	21,68 $\pm$ 7,37	16,27 $\pm$ 5,16
HPB-e	16,50 $\pm$ 5,22	6,73 $\pm$ 2,19	6,03 $\pm$ 1,84
CHPB	12,20 $\pm$ 3,12	9,32 $\pm$ 1,78	7,74 $\pm$ 2,30

No presente estudo constatou-se que as próstatas que apresentaram menor peso e menor volume foram as com diagnóstico de HPB-e, seguidos pelos CHPB, as Normais e HPB-ep.

ATALAN et al. (1999) avaliaram por meio de ultra-sonografia e histopatologia, 77 próstatas de cães inteiros e castrados e encontraram 16 atróficas com média de PP 6,32 g e VP 9,36 cm³, 17 próstatas normais onde a média do PP foi de 12,10 g e VP 14,90 cm³, três prostatites com média de PP 20,10 g e VP 22,57 cm³, 36 próstatas com HPB onde a média do PP foi de 32,71 g e o VP de 34,66 cm³ e cinco neoplásicas com médias de PP 78,65 g e VP 78,70 cm³. DI SANTIS (2003) estudando glândulas prostáticas caninas imaturas e maduras, com diferentes diagnósticos, encontrou como as mais leves as com HPB-e, seguidos pelas HPB-ep (papilífera e cística) e as mais pesadas foram as com CHPB e por último as normais.

Segundo BARSANTI & FINCO (1986) e ATALAN (1999) a avaliação de parâmetros como tamanho e volume da glândula são importantes para monitoração clínica e terapêutica da mesma.

5.2 Diagnóstico e avaliação histopatológica

As 29 glândulas prostáticas avaliadas apresentaram o seguinte diagnóstico geral: 16 glândulas com diagnóstico de hiperplasia epitelial (papilífera ou cística), três com hiperplasia estromal, seis glândulas apresentaram complexo hiperplasia prostática benigna, duas glândulas não apresentaram alteração histológica e foram classificadas como normais, uma com prostatite e uma com adenocarcinoma (Tabela 2 e Figura 3). O diagnóstico geral foi obtido pela análise das três partes de cada próstata.

Tabela 2 – Diagnóstico histológico das próstatas dos 29 cães oriundos do Centro de Zoonoses da cidade de Sertãozinho-SP.

Diagnóstico/Próstata	Frequência
Normal (N)	2
Prostatite (P)	1
Hiperplasia epitelial papilífera e cística (HPB-ep)	16
Hiperplasia estromal (HPB-e)	3
Complexo hiperplasia prostática benigna (CHPB)	6
Displasia ou PIN(D)	0
Adenocarcinoma	1
Total de próstatas	29

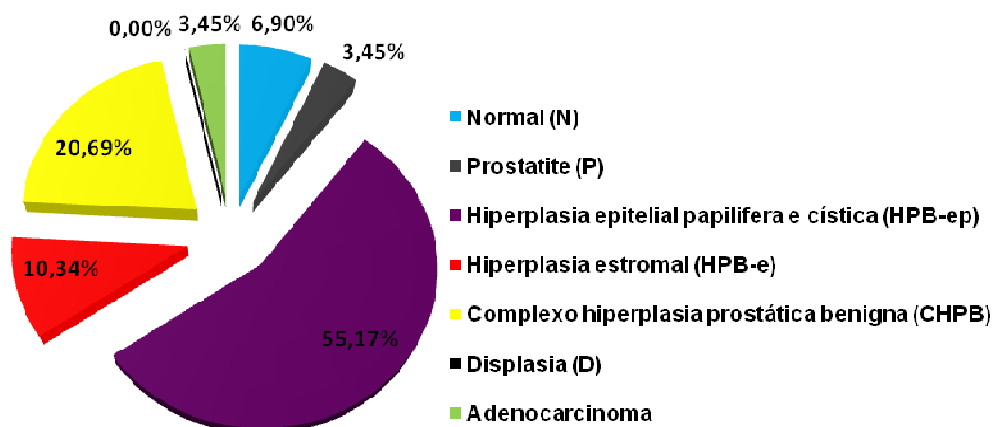


Figura 3 – Distribuição percentual dos diagnósticos histológicos de próstatas de cães oriundos do Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Sertãozinho-SP.

Pela disparidade dos dados obtidos não foi possível realizar estudo estatístico para verificar a possível correlação entre o diagnóstico geral de cada próstata com os parâmetros PC, PP, VP.

Foram examinados 87 fragmentos originários das 29 próstatas colhidas e destes 5,74% (n=5) não apresentaram alteração histológica, sendo considerados normais (Figura 5A), 2,30% (n=2) apresentaram apenas prostatite crônica (Figura 5B), 16,10% (n=14) apresentaram como diagnóstico hiperplasia estromal (Figura 5C), 55,17% (n=48) tiveram como diagnóstico hiperplasia epitelial (papilífera ou cística) (Figura 5D), 16,10% (n=14) apresentaram diagnóstico de complexo hiperplasia prostática benigna, ou seja, hiperplasia estromal, epitelial (papilífera e cística) no mesmo fragmento (Figura 6A), 3,44% (n=3) apresentaram displasia ou PIN (Figura 6B) e 1,14% (n=1) dos fragmentos apresentaram diagnóstico de adenocarcinoma (Figura 6C).

Tabela 3 – Diagnóstico histológico de fragmento cranial, medial e caudal das 29 próstatas de cão colhidas no Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Sertãozinho-SP.

Diagnóstico/ Fragmento	Cranial	Medial	Caudal	Total Fragmentos
Normal (N)	3	1	1	5
Prostatite (P)	0	1	1	2
Hiperplasia epitelial papilífera e cística (HPB-ep)	18	13	17	48
Hiperplasia estromal (HPB-e)	1	7	6	14
Complexo hiperplasia prostática benigna (CHPB)	6	4	4	14
Displasia ou PIN	1	2	0	3
Adenocarcinoma	0	1	0	1
Total Fragmentos	29	29	29	87

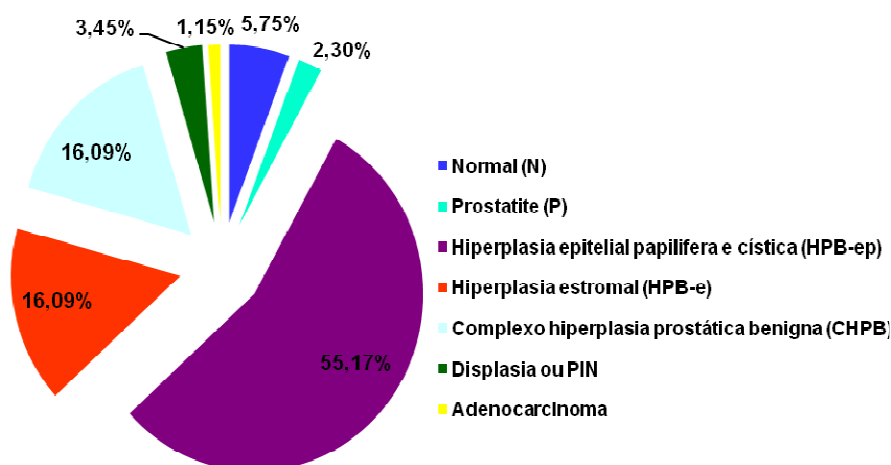


Figura 4 – Distribuição percentual dos diagnósticos histológicos de fragmentos de próstatas de cães oriundos do Centro de Zoonoses da cidade de Sertãozinho-SP.

Na presente pesquisa 93,10% das próstatas avaliadas, apresentaram algum tipo de alteração e quando comparado ao estudo dos fragmentos gerados dessas glândulas, essa porcentagem subiu para 94,25%. Sendo os animais selecionados de idade adulta, esse resultado corrobora com os achados de OLIVEIRA et al. (2007) nos quais encontraram 100% de alterações em 50 fragmentos avaliados provenientes de diferentes cães adultos e sem raça definida. Os autores OLSON et al. (1987); KRAWIEC, (1994) e DORFMAN & BARSANTI, (1995) citaram como conclusões de seus estudos a alta incidência de alterações prostáticas em animais adultos e idosos.

Em relação à quantidade de alterações na mesma glândula, houve uma frequência de 100% de presença de mais de uma alteração nas próstatas avaliadas. Também DI SANTIS (2003) e MOURA (2004) relataram o mesmo achado com frequência de 95% e 91%, respectivamente. O grande inconveniente dessa característica da próstata canina, em desenvolver diversas alterações em diferentes partes da mesma glândula, é a dificuldade do estabelecimento do diagnóstico, na clínica diária, nos atendimentos de animais com suspeita de alterações prostáticas.

As alterações mais encontradas no mesmo fragmento foram as HPBs e displasias associadas com infiltrados inflamatórios mononuclear, caracterizando quadros de prostatites variando de leves a acentuados, mesmo não sendo a alteração

mais evidente. A grande freqüência dos achados de duas ou mais alterações na mesma glândula prostática sugere que uma alteração seja fator predisponente ao estabelecimento de outras alterações. Ainda, LEE et al. (1997) afirmaram que dentre os fatores ambientais que contribuem para o desenvolvimento das HPBs estava a presença do infiltrado mononuclear não relacionado a microorganismos e que pode ser considerado um fator somático, já que estas células produzem interleucina que estimulam a formação de matriz pela síntese de colágeno, assim como promovem a proliferação das células estromais e epiteliais na glândula prostática.

O diagnóstico mais freqüentemente encontrado nos fragmentos prostáticos avaliados foi a HPB chegando a 87% das glândulas. Este achado está de acordo com os resultados de MOURA (2004) que encontraram 77% de alterações envolvendo alguma classificação de HPB.

Neste estudo, o diagnóstico de HPB foi dividido de acordo com o componente prostático que apresentou hiperplasia, resultando em HPB-ep aqueles com hiperplasia do tipo glandular com formações papilares e/ou císticas que tiveram freqüência de 55,17% nos fragmentos, os com HPB-e aqueles com hiperplasia no tecido estromal ou conjuntivo e apareceram em 16,09%, e os CHPB, que foram fragmentos prostáticos com hiperplasias glandulares e estromais, somaram 16,09% dos casos.

Essa classificação é semelhante à descrita por DI SANTIS (2003) o qual em seu estudo diferenciou as HPBs em estromal, epitelial cística, epitelial papilífera e hiperplasias complexas. Em nosso estudo, considerou-se a hiperplasia do tipo papilífera e cística no mesmo grupo (HPB-ep), já que as duas são de ordem glandular. Quanto às freqüências de aparecimento de cada HPB, DI SANTIS (2003) e MOURA (2004) encontraram em suas pesquisas que o aparecimento em maior número foi do CHPB, discordando dos achados deste estudo.

LEAV & LING (1968) relataram que a hiperplasia do tipo epitelial ou acinar ocorre devido a um excesso de andrógenos e a hiperplasia do componente estromal devido a um excesso de estrógenos. Estudos recentes demonstraram a localização dos receptores de estrógeno no componente estromal da próstata humana com HPB. Também GRIFFITHS et al. (1991) afirmaram que em cães saudáveis, investigações

IHCs evidenciaram a presença desses receptores tanto nas células estromais quanto epiteliais dos ductos da região peri-uretral. MOURA (2004) estudando receptores prostáticos para estrógenos e andrógenos em cães com glândula normal e com diferentes classificações de HPB não obteve marcação ao exame de IHQ. Enquanto que SCHULZE & BARRACK (1987) e LEAV (2001) obtiveram êxito nos componentes estromal e epitelial, pesquisando a imunorreatividade de receptores de estrógenos e andrógenos, respectivamente, na glândula próstática de cães.

A displasia glandular ou PIN mesmo não sendo encontrada na glândula prostática inteira, foi observada em 3,45% dos fragmentos avaliados e geralmente encontrava-se em áreas de intensa infiltração inflamatória como descrito por LAUFER - AMORIM (2001) e DI SANTIS (2003).

A displasia é a lesão precursora dos adenocarcinomas prostáticos. São compostas por focos únicos ou múltiplos de proliferação intra acinar com anaplasia nuclear, porém, não há invasão da membrana basal e foram observadas em 66% dos casos de neoplasia espontânea em próstata de cães. A PIN tem crescimento lento, pode invadir a membrana basal, então se diagnostica como câncer. O diagnóstico precoce da PIN é importante, pois o desenvolvimento do carcinoma pode levar anos, o que permitiria a utilização de terapias que pudessem evitar a progressão até a neoplasia (WATERS & BOSTWICK, 1997).

Segundo AQUILINA et al. (1998), a próstata humana e canina são semelhantes tanto morfológicamente quanto em relação à predisposição ao câncer. Nestas espécies, a PIN funciona como uma alteração que antecede a neoplasia prostática. Assim, os cães são modelos espontâneos de PIN, servindo como ferramenta importante na avaliação de agentes quimioterápicos. Os mesmos autores ao realizar um estudo com 199 próstatas de cães, obtidas em necropsia, observaram incidência de 3% de PIN. Já quando correlacionaram a incidência desta afecção com adenocarcinoma prostático, obtiveram 72% de positividade, dados similares aos humanos.

Os fragmentos com diagnóstico de prostatite somaram 2,30%, o diagnóstico foi baseado na presença de vários focos, sem alteração morfológica epitelial e estromal, de infiltrado inflamatório do tipo mononuclear linfo-plasmocitário. Segundo JOHNSTON

et al. (2000), uma das principais conseqüências da prostatite é a infecundidade, por essa provocar diminuição da motilidade e aumentar a taxa de espermatozóides morfológicamente anormais, diminuição da libido por dor no momento de contração prostática e disseminação da infecção para epidídimos e testículos.

Apenas um fragmento foi diagnosticado com adenocarcinoma, o que representou 1,15% das amostras avaliadas. Essa é uma alteração considerada em animais de idade avançada e essa característica é comum tanto em cães como em humanos (AQUILINA et al., 1998). As neoplasias prostáticas dos cães são extremamente agressivas e provocam metástase em vários órgãos (LEIB, 1986). A prevalência de metástases na espécie canina é de 80%, sendo que o pulmão é o órgão mais acometido (JOHNSTON et al., 2000) juntamente com os linfonodos pélvicos e o sistema esquelético (KOZLOWSKI, 1999).

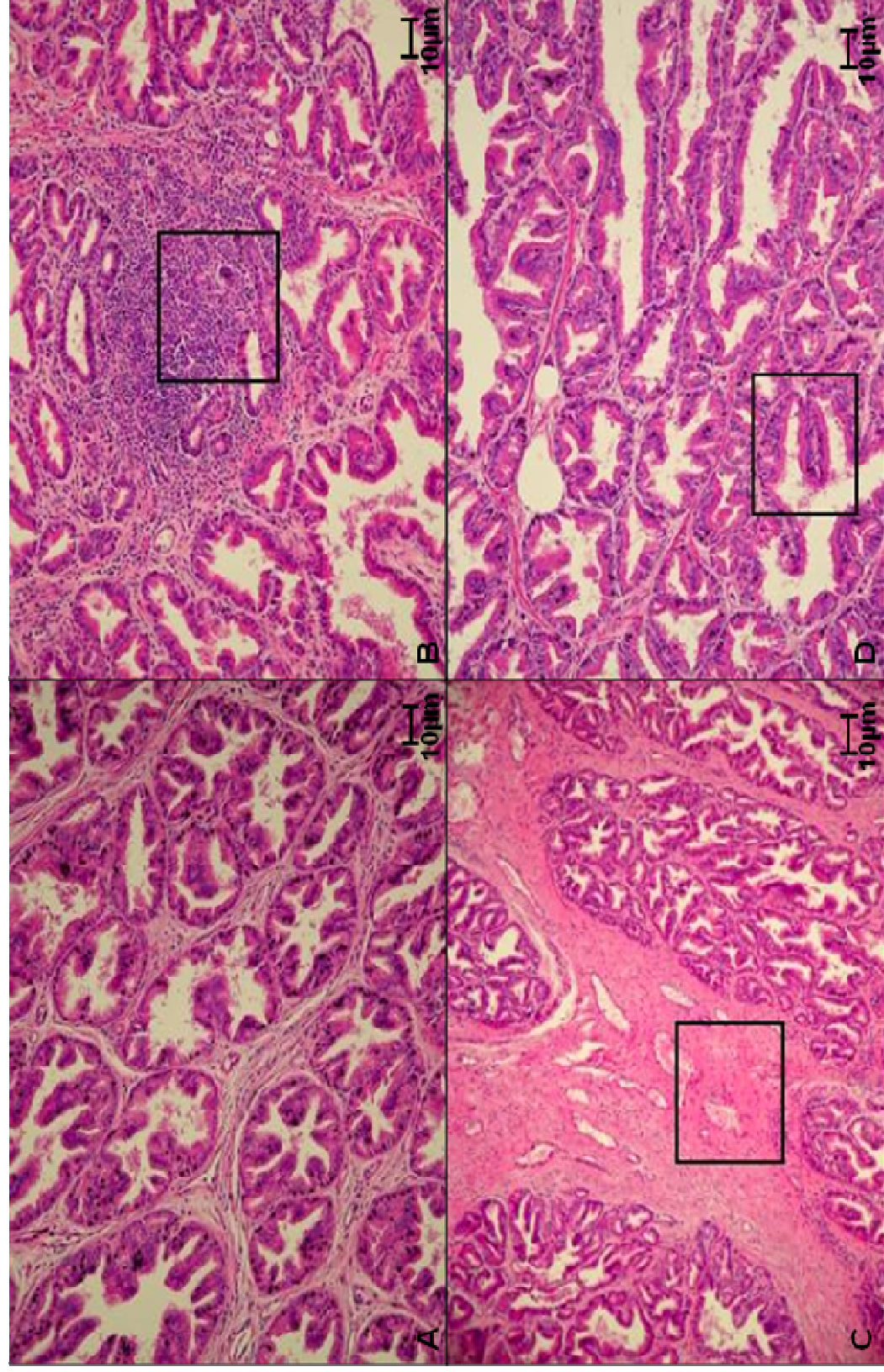


Figura 5 – Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino normal (A), prostatite destacando infiltrado inflamatório (B), HPB-e destacando hiperplasia estromal (C) e HPB-ep destacando hiperplasia epitelial glandular (D), HE, obj. 20x.

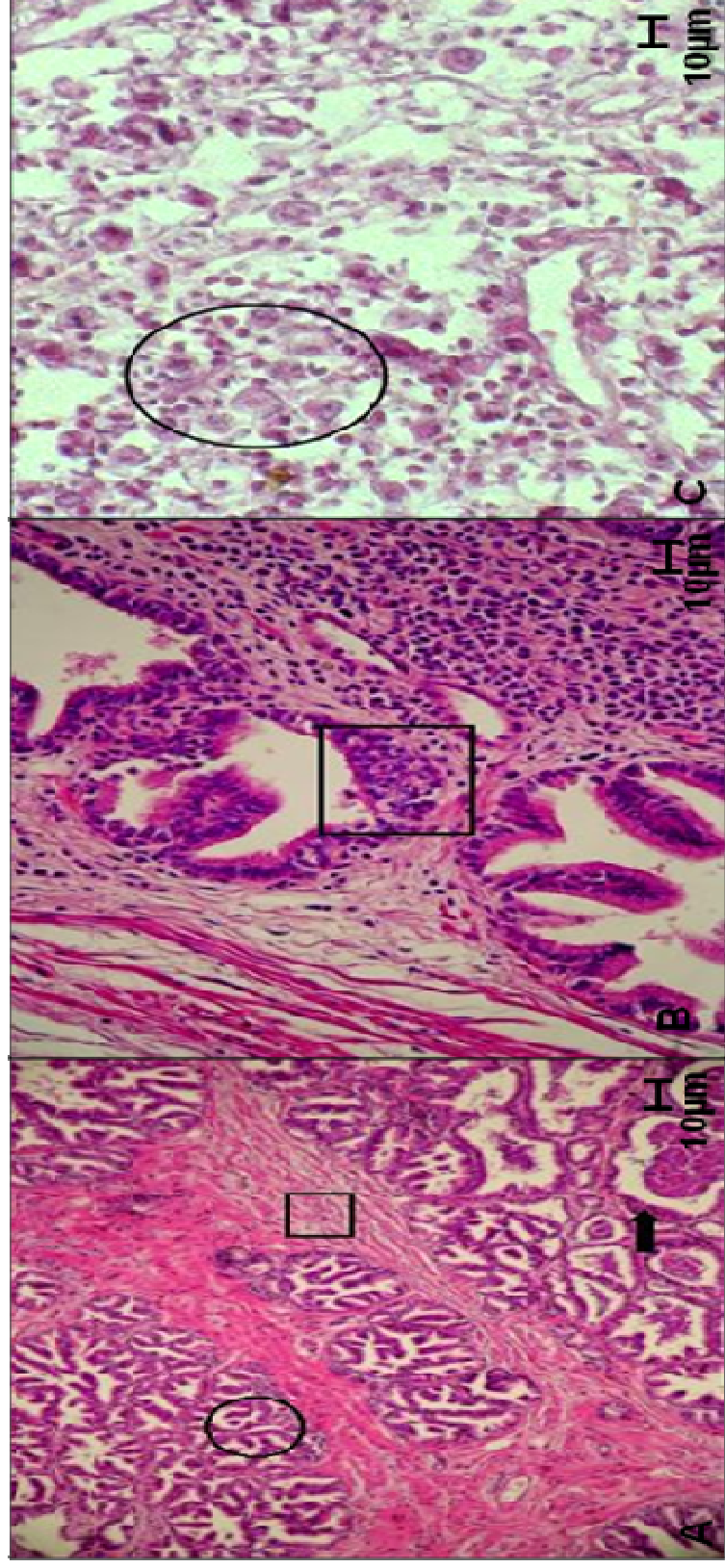


Figura 6 – Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino com CHIPB destacando proliferação epitelial (círculo), proliferação estromal (caixa) e áreas císticas (seta) (A, HE, obj. 10x), displasia destacando área displásicas (B, HE, obj. 40x), Adenocarcinoma destacando celular tumoradas (C, HE, obj. 20x).

5.3 Avaliação imunoistoquímica

5.3.1 Avaliação da proteína *CYR61* nas diferentes classificações de HBP versus N

Todos os fragmentos com diferentes classificações de HPB (n=18) e N (n=5) apresentaram marcação positiva para a proteína *CYR61* e os componentes estromal e epitelial acinar também tiveram marcação positiva (Figuras 7A, 7B, 7C e 8A). No Quadro 5 estão descritos os componentes estromais e epiteliais que apresentaram marcação mais evidente para cada diagnóstico e classificação de HPB.

Quadro 5 – Componentes estromais e epiteliais acinar que apresentaram maior destaque na marcação para a proteína *CYR61* em fragmentos prostáticos caninos classificados como normais e diferentes graus de hiperplasia prostática benigna (HPB)

Proteína	Diagnósticos							
	Normal		HPB-ep		HPB-e		CHPB	
	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel
<i>CYR61</i>	FML, MLA	núcleo	FML, MLA	núcleo	FML, MLA	citoplasma	FML, F	núcleo

Na Tabela 4 são apresentados os valores de intensidade e área tingida obtidos após análise pelo *software*.

Tabela 4 - Médias±erro padrão da média para intensidade da marcação e área tingida com a proteína *CYR61* em fragmentos de próstata de cão

CYR61			
DA das próstatas	N° de fragmentos	Valor médio de intensidade	Valor médio de área tingida (%)
N	5	4134±1157	19,024±1,733 ^b
HPB-ep	6	4017±1858	17,293±1,822 ^b
HPB-e	6	3888±787	21,346±0,577 ^{ab}
CHPB	6	3381±790	25,739±1,951 ^a

Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (p<0,05).

Para a área tingida houve diferenças estatísticas entre os diagnósticos N versus CHPB ($p < 0,05$) e HPB-ep versus CHPB ($p < 0,01$) no teste não paramétrico de Tukey.

5.3.2 Avaliação da proteína *CYR61* nos diagnósticos de P versus N

Todos os fragmentos avaliados com diagnóstico N ($n=5$) e prostatite ($n=2$) apresentaram marcação positiva para a proteína *CYR61* e os componentes estromal e epitelial acinar também tiveram marcação positiva (Figura 8B). No Quadro 6 estão descritos os componentes estromais e epiteliais que apresentaram marcação mais evidente para cada diagnóstico avaliado.

Quadro 6 – Componentes estromais e epiteliais acinar que apresentaram maior destaque na marcação para a proteína *CYR61* em fragmentos prostáticos caninos normais e com prostatite

Proteína	Diagnósticos			
	Normal		Prostatite	
	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel
	<i>CYR61</i>	FML, MLA núcleo	FML, CM núcleo, citoplasma	

5.3.3 Avaliação da proteína *CYR61* nos diagnósticos de Displasia ou PIN versus N

Nos fragmentos com DA compatível com displasia (Figura 8C) o componente estromal que mais apresentou coloração foi a FML e a F seguido das CM e o componente epitelial foi o núcleo, porém houve marcação discreta no citoplasma. No Quadro 7 estão descritos os componentes estromais e epiteliais que apresentaram forte marcação para cada diagnóstico avaliado.

Quadro 7 – Componentes estromais e epiteliais acinar que apresentaram maior destaque na marcação para a proteína *CYR61* em fragmentos prostáticos caninos normais e com displasia ou PIN

Proteína	Diagnósticos			
	Normal		Displasia ou PIN	
	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel
	<i>CYR61</i>	FML, MLA núcleo	FML, F	núcleo, citoplasma

O anticorpo anti-*CYR61* mostrou-se efetivo em marcar componentes estromais e epiteliais em todos os diagnósticos histológicos de fragmentos prostáticos caninos avaliados, mesmo que em diferentes intensidades de marcação entre e dentro de cada componente avaliado. Este achado pode ser explicado por existir evidências apontando que esta proteína está distribuída de forma diferente na matriz extracelular, em partes da célula ou na superfície da mesma (YANG & LAU, 1991). Existe uma estreita relação da proteína e seus principais receptores e ligantes, e por isso, acredita-se que a proteína seja sintetizada perto de seu local de ação (KIREEVA et al., 1997). Estudos com próstatas humanas com HPB determinaram a localização da proteína *CYR61* tanto no epitélio acinar como em estruturas estromais. Porém a imunorreatividade não seguiu um padrão para todas as amostras, ou seja, os autores encontraram em algumas amostras imunorreatividade nos dois componentes (estromal e epitelial) e em outras a marcação ocorreu em apenas um dos componentes avaliados, e os autores não determinaram onde ocorreu a imunorreatividade nas estruturas de cada componente avaliado (SAKAMOTO et al., 2004).

No presente estudo, os componentes estromais que mais expressaram a proteína *CYR61* foram a fibra muscular lisa, musculatura lisa das artérias e fibroblastos. A proteína *CYR61* é rapidamente expressada em células como fibroblastos e células endoteliais em resposta a fatores de crescimento e citocinas (KIREEVA et al., 1996), e foi identificada em células de músculo liso tanto no citoplasma quanto no núcleo (TAMURA et al., 2001). Acredita-se que a presença desta proteína em determinadas células como fibroblastos, células endoteliais e musculatura lisa, seja a razão pela qual

está intimamente ligada a processos angiogênicos, reparação tecidual, proliferação e adesão celular (BRIDGSTOCK, 1999).

Com relação ao componente epitelial acinar a proteína não seguiu um padrão uniforme, visto que em alguns diagnósticos houve maior imunorreatividade no núcleo e em outros no citoplasma e as vezes em ambos concomitantemente. Estudos com células de músculo liso (TAMURA et al., 2001) e com placentas no desenvolvimento embrionário (KIREEVA et al., 1997) também identificaram imunorreatividade em citoplasma e/ou núcleo das células avaliadas. Acredita-se que o motivo seja o mesmo já explicado anteriormente, a proteína é sintetizada e distribuída de acordo com o estímulo e local de ação.

Em pesquisas recentes, ficou comprovada uma ativação exacerbada da proteína *CYR61* no trato reprodutor na progressão de alterações prostáticas, principalmente a HPB em humanos e cães (SAKAMOTO et al., 2003; OLIVEIRA, 2005) e em enfermidades endometriais em humanos (MACLAUGHLAN et al., 2007).

Nesta pesquisa houve um grande número de amostras com diferentes tipos de HPB, o que permitiu formar e avaliar diferentes grupos de hiperplasias frente ao diagnóstico normal. Após análise dos dados obtidos, encontrou-se diferença significativa entre os diagnósticos normal versus CHPB-ep e HPB-ep versus CHPB com relação à fração de área onde houve imunorreação. Pode-se concluir que os fragmentos de próstatas normais e com HPB-ep apresentaram maior intensidade de imunorreação, porém com menor fração de área tingida, enquanto que os fragmentos com CHPB tiveram marcação em uma fração maior de área para que houvesse valor similar de intensidade de imunorreação. Com relação a este dado não se encontrou relatos a respeito de comparação entre intensidade e área tingida em diferentes tratamentos com a proteína *CYR61*.

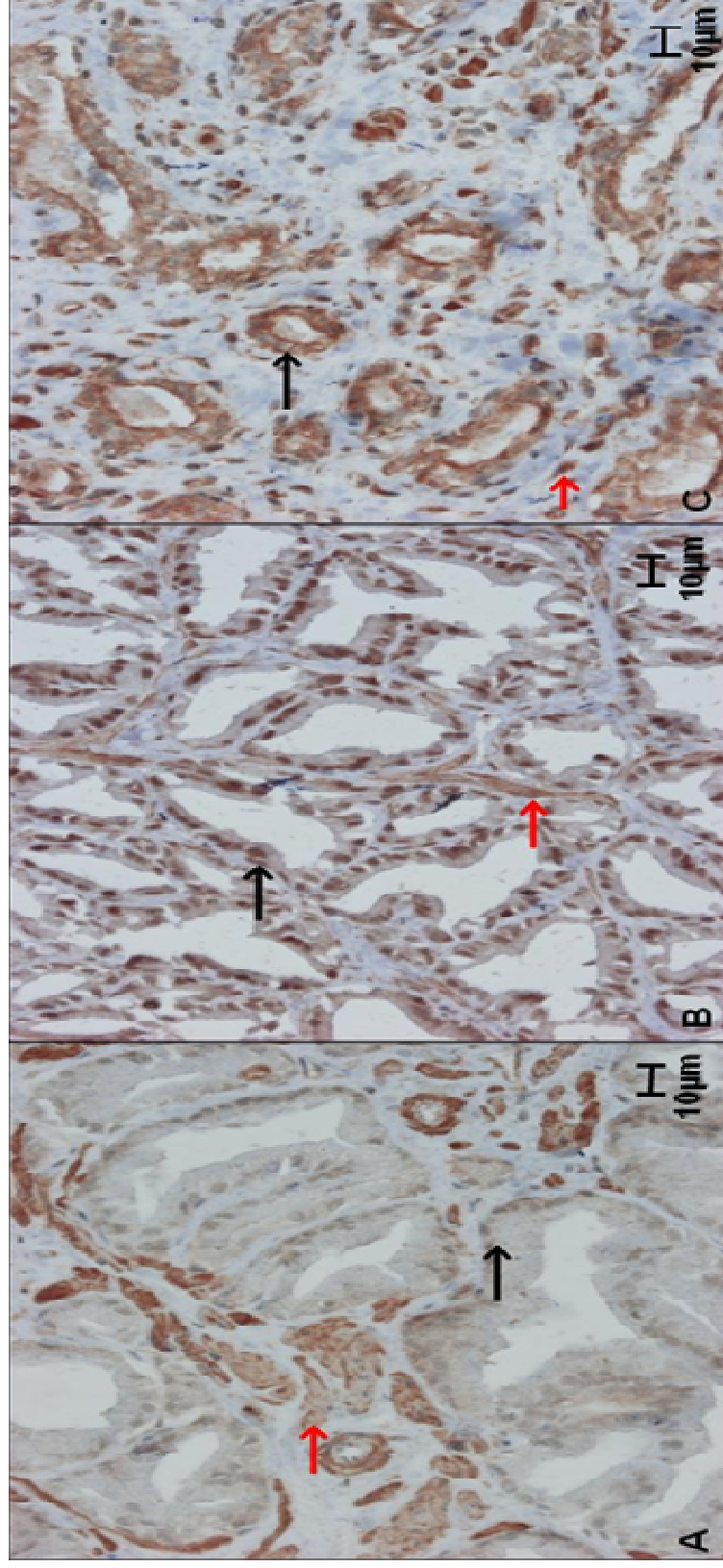


Figura 7 – Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino normal (A), HPB-ep (B) e HPB-e (C), marcado com a proteína *CYR61*, evidenciando nas setas: componente estromal (vermelha) e componente epitelial (preta), método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.

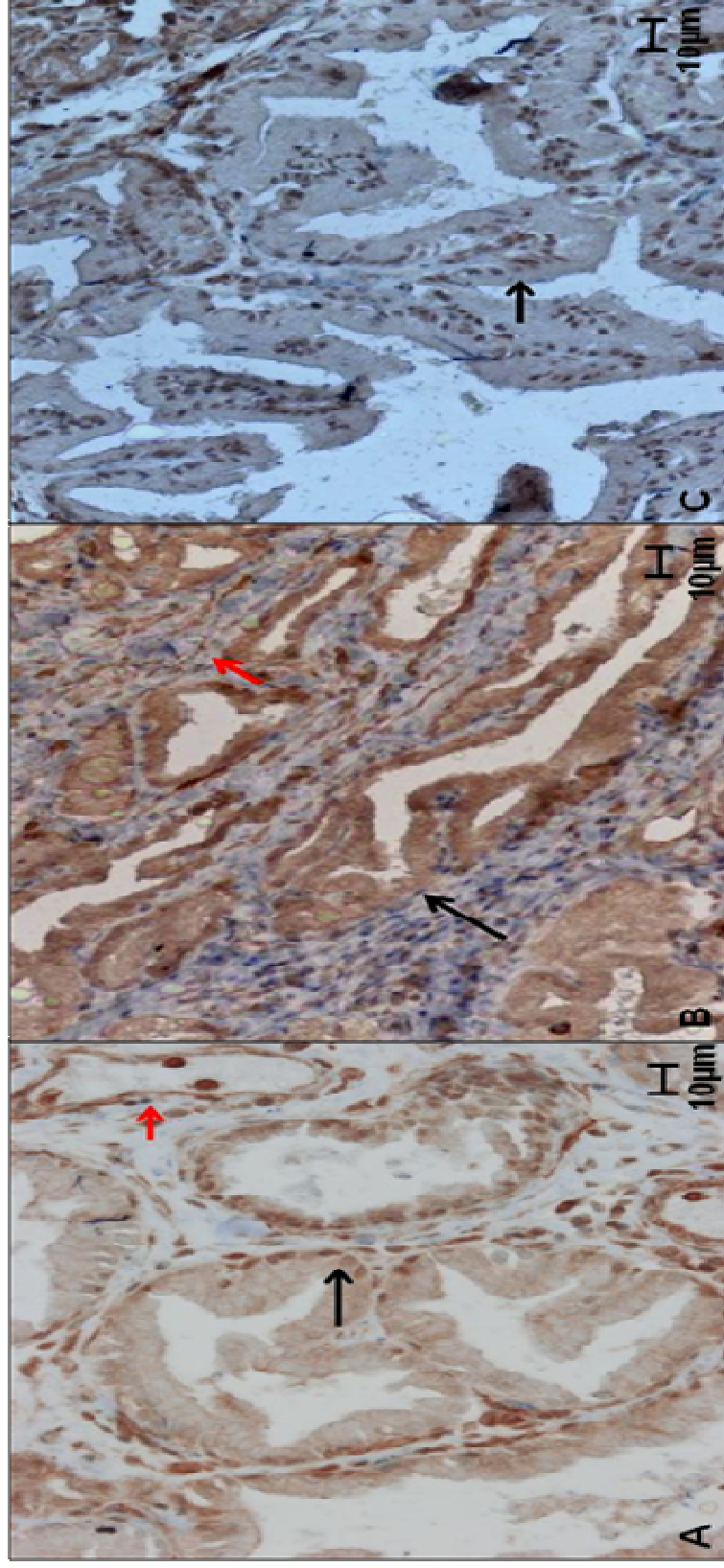


Figura 8 – Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino com diagnóstico de CHPB (A), prostatite (B) e displasia (C), marcado com a proteína *CYR61*, evidenciando nas setas: componente estromal (vermelha) e componente epitelial (preta), método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.

5.3.4 Avaliação do fator de crescimento EGF nas diferentes classificações de HPB versus N

Todos os fragmentos normais e os que foram classificados em diferentes graus de HPB apresentaram marcação positiva para o fator de crescimento EGF e os componentes estromal e epitelial acinar também tiveram marcação positiva (Figuras 9A, 9B, 9C e 10A). No Quadro 8 estão descritos os componentes estromais e epiteliais que apresentaram marcação mais evidente em cada diagnóstico avaliado.

Quadro 8 – Componentes estromais e epiteliais acinar que apresentaram maior destaque na marcação do EGF em fragmentos prostáticos caninos classificados como normais e com diferentes graus de hiperplasia prostática benigna (HPB)

Proteína	Diagnósticos							
	Normal		HPB-ep		HPB-e		CHPB	
	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel
EGF	FML, F	núcleo	FML	núcleo	FML	núcleo	FML, CE	núcleo

Na Tabela 5 são apresentados os valores de intensidade e área tingida obtidos após análise pelo *software*.

Tabela 5 - Médias $\pm$ erro padrão da média para intensidade da marcação e área tingida com o EGF em fragmentos de próstata de cão

EGF			
DA das próstatas	Nº de fragmentos	Valor médio de intensidade	Valor médio de área tingida (%)
N	5	2765 $\pm$ 742	2,893 $\pm$ 0,245
HPB-ep	6	2390 $\pm$ 150	3,296 $\pm$ 0,340
HPB-e	6	2673 $\pm$ 254	3,055 $\pm$ 0,353
CHPB	6	2422 $\pm$ 275	2,455 $\pm$ 0,545

Nos parâmetros avaliados não houve diferença estatística entre os diagnósticos marcados com o fator de crescimento EGF.

5.3.5 Avaliação do fator de crescimento EGF nos diagnósticos de P versus N

Todos os fragmentos normais e com prostatite avaliados no estudo apresentaram marcação positiva para a proteína EGF e os componentes estromal e epitelial acinar também tiveram marcação positiva (Figura 10B). No Quadro 9 estão descritos os componentes estromais e epiteliais que apresentaram marcação mais evidente em cada diagnóstico avaliado.

Quadro 9 – Componentes estromais e epiteliais que apresentaram maior marcação para o EGF nos fragmentos prostáticos normais e com prostatite de cão

Proteína	Diagnósticos			
	Normal		Prostatite	
	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel
EGF	FML, F	núcleo	FML, F	núcleo

5.3.6 Avaliação do fator de crescimento EGF nos diagnósticos de Displasia ou PIN versus N

Todos os fragmentos normais e com displasia ou PIN avaliados no estudo apresentaram marcação positiva para a proteína EGF e os componentes estromal e epitelial acinar também tiveram marcação positiva (Figura 10C). No Quadro 10 estão descritos os componentes estromais e epiteliais que apresentaram marcação mais evidente em cada diagnóstico avaliado.

Quadro 10 – Componentes estromais e epiteliais que apresentaram maior marcação para o EGF nos fragmentos prostáticos caninos normais e com displasia ou PIN

Proteína	Diagnósticos			
	Normal		Displasia ou PIN	
	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel
EGF	FML, MLA	núcleo	FML, CE	citoplasma

Com relação ao anticorpo anti-EGF, este também se mostrou efetivo na marcação de componentes estromais e epiteliais dos fragmentos de próstata canina avaliados. Estudos apontam que os componentes da família do EGF possuem uma localização extensa dentro do organismo. Em camundongos, a fonte principal dos precursores de EGF e TGF- α é a glândula submaxilar (RALL et al., 1985) e nos humanos a fonte principal são as glândulas de Bruner no duodeno, mas os precursores também foram encontrados em pequenas quantidades no cérebro, rins, pulmão, músculo estriado, próstata, testículo, ovários, útero, glândula mamária e fluidos corporais como saliva, leite, urina (CATTERTON et al., 1979; IMAI, 1982; SPORN et al., 1983; KASSELBERG et al., 1985; ROBERTS et al., 1985; LYNCH et al., 1987; MUSTOE et al., 1987; SCHULTZ et al., 1987) e em cães o precursor do EGF foi isolado na urina (KOBAYASHI et al., 1985).

O componente estromal que mais apresentou imunorreação pelo anti-EGF foi a fibra muscular lisa em todos os diagnósticos avaliados. Estudos foram realizados em cães para verificar a ação deste fator de crescimento nas fibras musculares lisas das artérias com diferentes protocolos anestésicos, e houve vasodilatação (GAN et al., 1987), o que confirma que a proteína EGF encontra-se presente e promove ação em fibras musculares lisas de cães.

Em relação ao componente epitelial acinar, houve marcação mais evidente no núcleo das células, diferentemente do que ocorreu com diagnóstico de displasia ou PIN onde houve marcação no citoplasma. Um estudo com diferentes tecidos de humanos de idades variando de feto a adultos localizaram por IHQ uma marcação nuclear em glândula sudorípara, glândula mamária em lactação e glândula submandibular (KASSELBERG et al., 1985). Já em pesquisa com suíno mestiços com a finalidade de localizar o EGF, TGF- α e EGFr no trato reprodutor masculino, o EGF foi identificado no citoplasma das células epiteliais das próstatas avaliadas (OLIVA-HERNANDEZ & PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008). Como os componentes da família EGF tem localização extensa no organismo, e participam de processos de desenvolvimento normal e também em alterações teciduais acredita-se que o fato de ter sido identificado nos dois

componentes epiteliais avaliados, seja a proximidade do local de ativação do seu receptor, bem como o tipo de sinal enviado.

Acredita-se que em órgãos como próstata e rins a produção de EGF é estimulada como resposta a alguma agressão no tecido como, por exemplo, condições de acidez e aumento nos níveis de prostaglandina E_2 (PGE_2) metabólito da COX_2 (Ciclooxigenase 2) frente a algum processo inflamatório (KASSELBERG et al., 1985).

Devido ao grande número de HPB encontrado, avaliaram-se diferentes grupos de hiperplasias frente ao diagnóstico normal. Após análise estatística dos dados obtidos (Tabela 5) verificou-se que não houve diferenças significativas entre os diagnósticos avaliados.

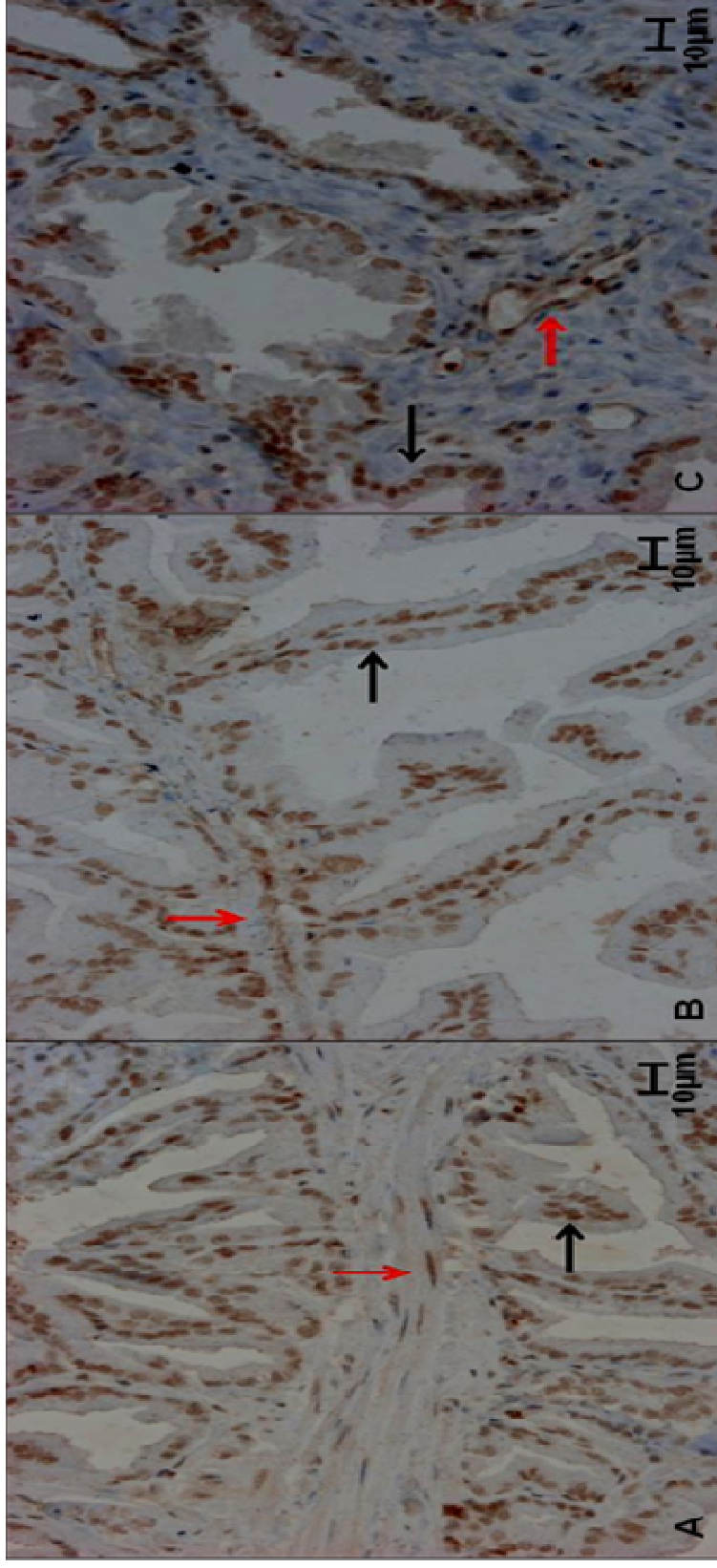


Figura 9 – Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino normal (A), HPB-ep (B) e HPB-e (C), marcado com a proteína EGF, evidenciando nas setas: componente estromal (vermelha) e componente epitelial (preta), método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.

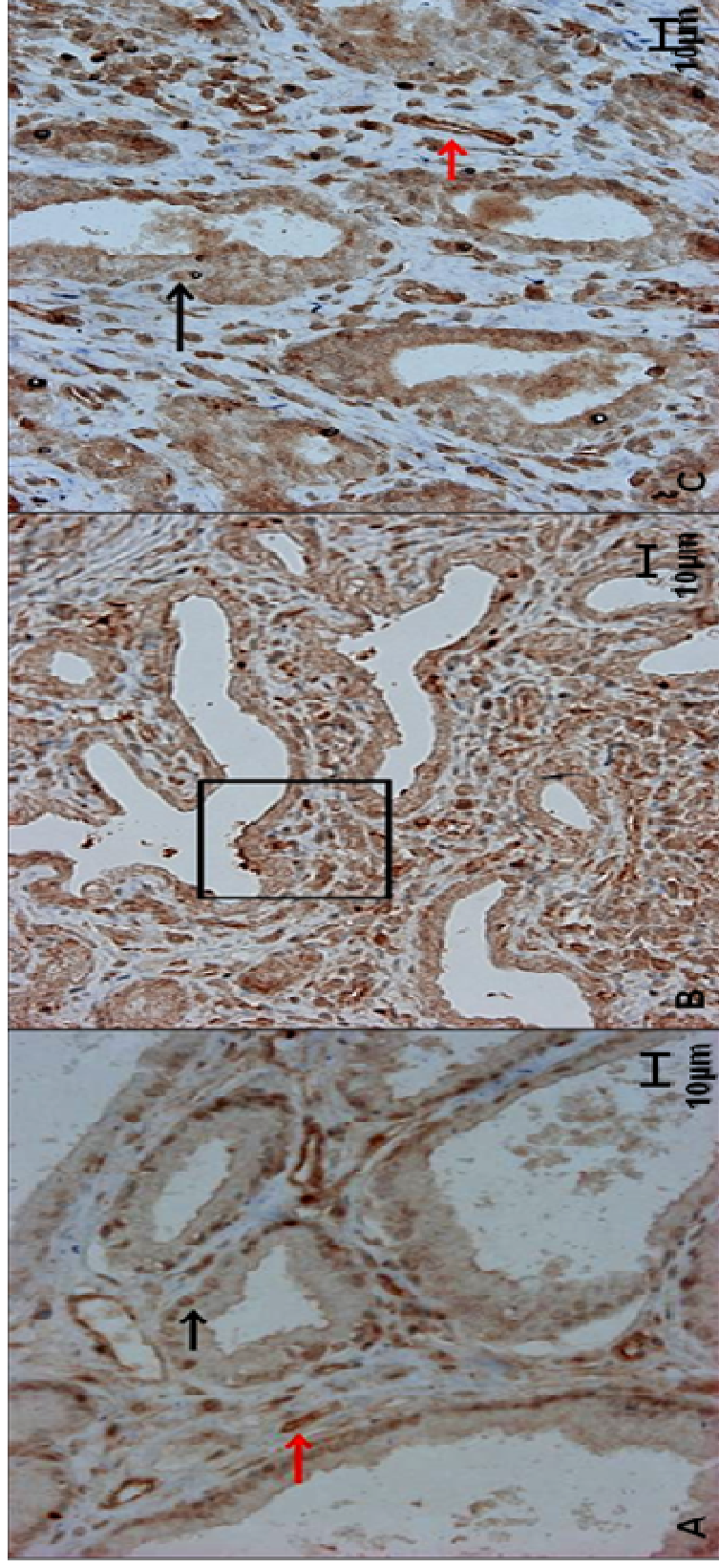


Figura 10 – Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino com diagnóstico de CHPB (A), prostatite (B) e displasia (C), marcado com a proteína EGF, evidenciando nas setas: componente estromal (vermelha) e componente epitelial (preta), na caixa, componentes estromais e epiteliais, método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.

5.3.7 Avaliação do fator de crescimento TGF- α nas diferentes classificações de HPB versus N

Todos os fragmentos normais e os que foram classificados em diferentes graus de HPB apresentaram marcação positiva para o fator de crescimento TGF- α e os componentes estromal e epitelial acinar também tiveram marcação positiva (Figuras 11A, 11B, 11C e 12A). No Quadro 11 estão descritos os componentes estromais e epiteliais que apresentaram marcação mais evidente em cada diagnóstico avaliado.

Nos fragmentos normais, os componentes estromais não apresentaram um destaque na marcação com o fator de crescimento.

A marcação no citoplasma das células secretoras dos fragmentos prostáticos avaliados teve como característica comum a forma puntiforme perinuclear.

Quadro 11 – Componentes estromais e epiteliais acinar que apresentaram maior destaque na marcação para o TGF- α em fragmentos prostáticos de cão classificados como normais e com diferentes graus de hiperplasia prostática benigna (HPB)

Proteína	Diagnósticos							
	Normal		HPB-ep		HPB-e		CHPB	
	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel
TGF- α	Sem destaque	citoplasma	FML, CM	citoplasma	CM, FML, F	citoplasma	CE	citoplasma

Na Tabela 6 são apresentados os valores de intensidade e área tingida obtidos após análise pelo *software*.

Tabela 6- Médias $\pm$ erro padrão da média para intensidade da marcação e área tingida com o TGF- α em fragmentos de próstata de cão

TGF- α			
DA das próstatas	N° de fragmentos	Valor médio de intensidade	Valor médio de área tingida (%)
N	5	3950 $\pm$ 328	3,317 $\pm$ 0,232
HPB-ep	6	2546 $\pm$ 259	2,879 $\pm$ 0,562
HPB-e	6	2830 $\pm$ 374	3,003 $\pm$ 0,186
CHPB	6	3939 $\pm$ 696	3,496 $\pm$ 0,522

Nos parâmetros avaliados não houve diferença estatística entre os diagnósticos marcados com o fator de crescimento TGF- α .

5.3.8 Avaliação do fator de crescimento TGF- α nas diferentes classificações de P versus N

Todos os fragmentos normais e com prostatite avaliados no estudo apresentaram marcação positiva para a proteína TGF- α e os componentes estromal e epitelial acinar também tiveram marcação positiva (Figura 12B). No Quadro 12 estão descritos os componentes estromais e epiteliais que apresentaram marcação mais evidente em cada diagnóstico avaliado.

Quadro 12 – Componentes estromais e epiteliais que apresentaram maior marcação para o TGF- α nos fragmentos prostáticos normais e com prostatite de cão

Proteína	Diagnósticos			
	Normal		Prostatite	
	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel
TGF- α	Sem destaque	citoplasma	FML, F	citoplasma

5.3.9 Avaliação do fator de crescimento TGF- α nas diferentes classificações de Displasia ou PIN versus N

Todos os fragmentos normais e com displasia ou PIN avaliados no estudo apresentaram marcação positiva para a proteína TGF- α e os componentes estromal e epitelial acinar também tiveram marcação positiva (Figura 12C). No Quadro 13 estão descritos os componentes estromais e epiteliais que apresentaram marcação mais evidente em cada diagnóstico avaliado.

A marcação no citoplasma das células secretoras dos fragmentos prostáticos avaliados teve como característica comum a forma puntiforme perinuclear.

Quadro 13 – Componentes estromais e epiteliais que apresentaram maior marcação para o TGF- α nos fragmentos prostáticos caninos normais e com displasia ou PIN

Proteína	Diagnósticos			
	Normal		Displasia ou PIN	
	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel
TGF- α	Sem destaque	citoplasma	FML, F, CM	citoplasma

Os estudos com o anti-TGF- α em fragmentos prostáticos caninos também mostrou-se passível de ser utilizado, já que houve marcação em cada componente dos fragmentos prostáticos analisados. Em cães este fator de crescimento foi localizado em células gástricas (CHEN et al., 1993), rins (DEMPSEY & COFFEY, 1994), útero em diferentes fases do ciclo estral (TAMADA et al., 2005) e pela grande semelhança entre os outros membros da Família EGF acredita-se que o TGF- α esteja presente nos mesmos tecidos onde foi localizado o EGF (RALL et al., 1985).

No componente estromal dos fragmentos avaliados, o TGF- α esteve presente em maior destaque nas fibras musculares lisas, célula mononuclear e fibroblasto. No diagnóstico normal não houve imunorreatividade que destacasse algum componente estromal. O TGF- α está envolvido em processos de crescimento e desenvolvimento normal de diversos tecidos, desempenha papel importante na reparação de feridas, é promotor angiogênico e tem função imunológica por ser encontrado em macrófagos e eosinófilos (KUMAR et al., 1995). A ação desenvolvida por esse fator de crescimento explica os componentes em que houve maior imunorreatividade no componente estromal dos fragmentos avaliados.

Já no componente epitelial acinar todos os fragmentos avaliados apresentaram imunorreatividade no citoplasma. Esse fator de crescimento foi identificado no citoplasma da glândula prostática de suínos (OLIVA-HERNANDEZ & PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008). Em estudo com fragmentos prostáticos com diagnósticos normais, HPB e carcinoma prostático o TGF- α foi imunolocalizado via IHQ tanto em células basais quanto nas células colunares secretoras e em alguns componentes estromais (DE MIGUEL et al., 1999). Em humanos as células epiteliais prostáticas são produtoras de TGF- α (TAYLOR & RAMSDELL, 1993).

Quanto à característica de imunorreação no citoplasma das células epiteliais dos fragmentos prostáticos avaliados, descrita como puntiforme na região perinuclear, não se encontrou dados na literatura que pudessem servir de comparação e auxiliar na discussão.

Os diferentes grupos de HPB tiveram suas intensidades avaliadas frente aos dados do diagnóstico normal quanto ao fator de crescimento TGF- α , e após análise dos valores (Tabela 6), verificou-se que não houve diferenças significativas entre os diagnósticos avaliados.

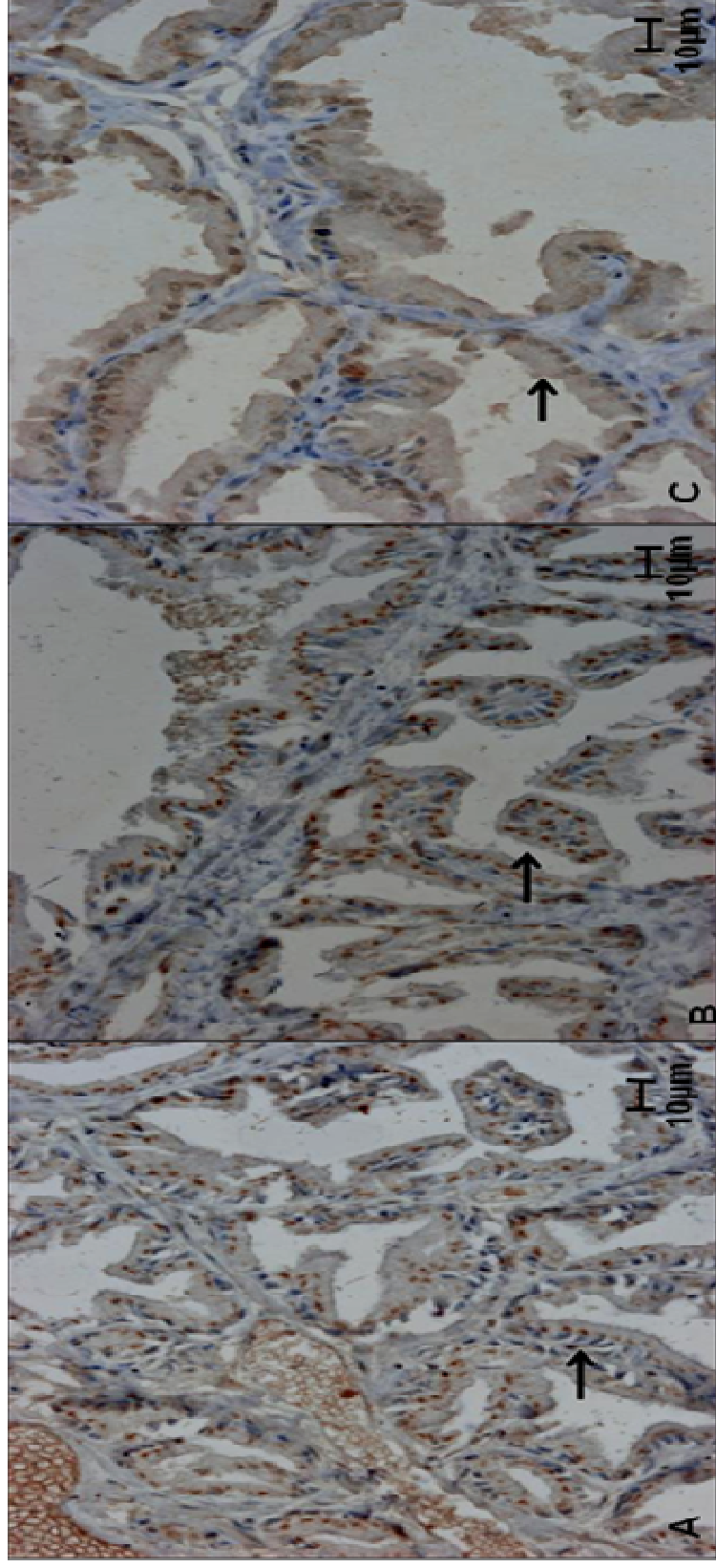


Figura 11 – Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino normal (A), HPB-ep (B) e HPB-e (C), marcado com a proteína TGF- α , evidenciando na seta: componente epitelial, método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.

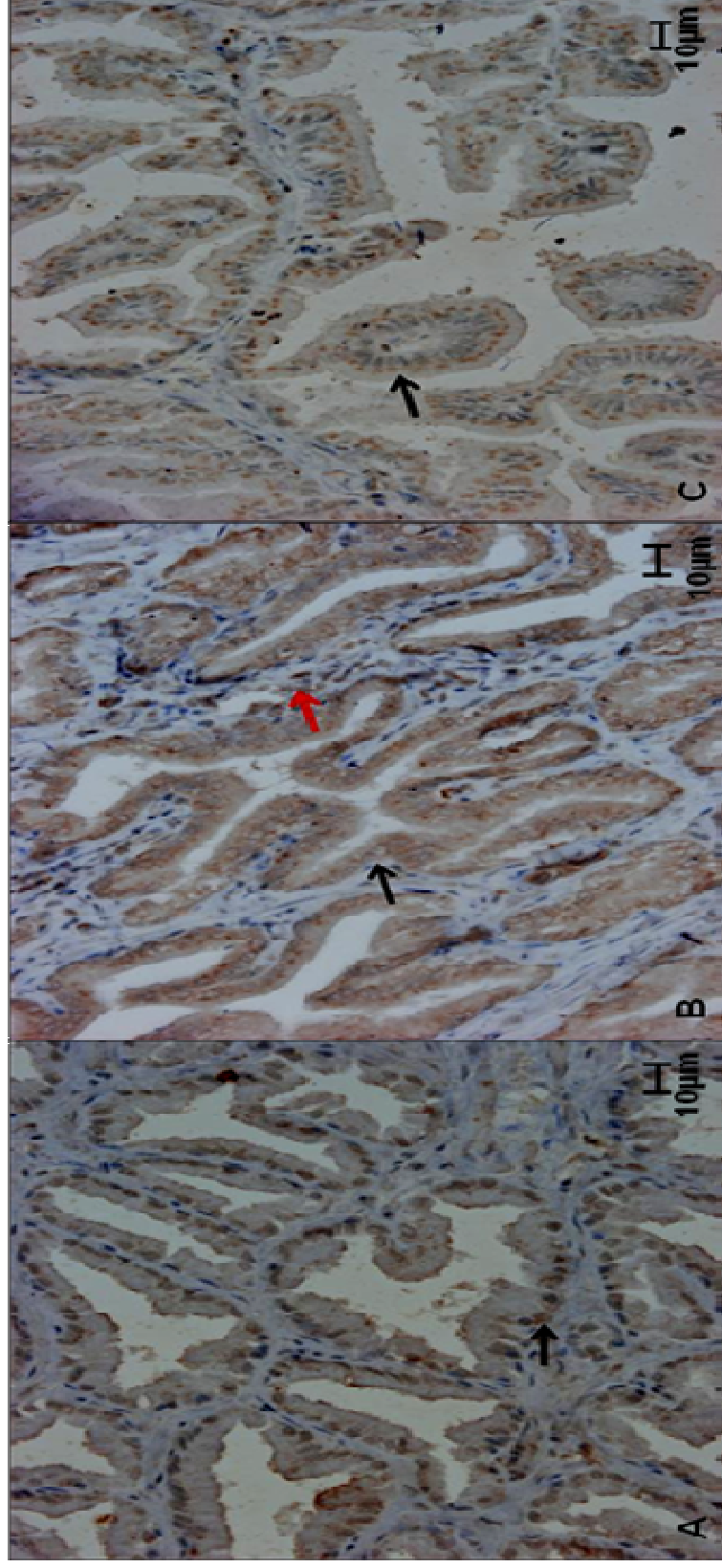


Figura 12 – Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino com diagnóstico de CHPB (A), prostatite (B) e displasia (C), marcado com a proteína TGF- α , evidenciando nas setas: componente estromal (vermelha) e componente epitelial (preta), método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.

5.3.10 Avaliação do EGFr nas diferentes classificações de HPB versus N

Todos os fragmentos normais e os que foram classificados em diferentes graus de HPB apresentaram marcação positiva para o EGFr e os componentes estromal e epitelial acinar também tiveram marcação positiva (Figuras 13A, 13B, 13C e 14A). No Quadro 14 estão descritos os componentes estromais e epiteliais que apresentaram marcação mais evidente em cada diagnóstico avaliado.

Nos fragmentos prostáticos normais, os componentes estromais não apresentaram um destaque na marcação com o fator de crescimento EGFr.

Quadro 14 – Componentes estromais e epiteliais acinar que apresentaram maior destaque na marcação para o EGFr em fragmentos prostáticos de cão classificados como normais e com diferentes graus de hiperplasia prostática benigna (HPB)

Proteína	Diagnósticos							
	Normal		HPB-ep		HPB-e		CHPB	
	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel
EGFr	Sem destaque	núcleo	FML, MLA	núcleo	FML, F	núcleo	FML, F	núcleo

Na Tabela 7 são apresentados os valores de intensidade e área tingida obtidos após análise pelo *software*.

Tabela 7- Médias±erro padrão da média para intensidade da marcação e área tingida com a proteína EGFr em fragmentos de próstata de cão

EGF-r			
DA das próstatas	Nº de fragmentos	Valor médio de intensidade	Valor médio de área tingida (%)
N	5	1378±331	1,000±0,192
HPB-ep	6	1829±550	1,528±0,518
HPB-e	6	2645±426	2,208±0,469
CHPB	6	2714±248	1,686±0,359

Nos parâmetros avaliados não houve diferença estatística entre os diagnósticos marcados com o EGFr.

5.3.11 Avaliação do EGFr nas diferentes classificações de P versus N

Todos os fragmentos normais e com prostatite avaliados no estudo apresentaram marcação positiva para a proteína EGFr e os componentes estromal e epitelial acinar também tiveram marcação positiva (Figura 14B). No Quadro 15 estão descritos os componentes estromais e epiteliais que apresentaram marcação mais evidente em cada diagnóstico avaliado.

Quadro 15 – Componentes estromais e epiteliais que apresentaram maior marcação para o EGFr nos fragmentos prostáticos normais e com prostatite de cão

Proteína	Diagnósticos			
	Normal		Prostatite	
	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel
EGFr	Sem destaque	núcleo	FML, F	núcleo

5.3.12 Avaliação do fator de crescimento EGFr nas diferentes classificações de Displasia ou PIN versus N

Todos os fragmentos normais e com displasia ou PIN avaliados no estudo apresentaram marcação positiva para a proteína EGFr e os componentes estromal e epitelial acinar também tiveram marcação positiva (Figura 14C). No Quadro 16 estão descritos os componentes estromais e epiteliais que apresentaram marcação mais evidente em cada diagnóstico avaliado.

Quadro 16 – Componentes estromais e epiteliais que apresentaram maior marcação para o EGFr nos fragmentos prostáticos caninos normal e com displasia ou PIN

Proteína	Diagnósticos			
	Normal		Displasia ou PIN	
	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel
EGFr	Sem destaque	núcleo	FML, F	núcleo

Todos os fragmentos analisados para o anticorpo anti-EGFr apresentaram imunorreatividade positiva e com isso o anticorpo mostrou-se efetivo no estudo com tecido prostático canino. O EGFr foi identificado em cadelas por NERURKAR et al. (1987) em tumores de glândula mamária, por TAMADA et al. (2005) em útero de nas diferentes fases do ciclo estral e IGLESIAS-NUÑEZ et al. (2008) em útero normal e acometido por complexo hiperplasia endometrial cística (CHEC). No trato reprodutor de cães machos, o EGFr foi associado a aumento de fertilidade, pois está envolvido na proliferação das células de Sertoli quando estimulado pelos receptores acetilcolina-muscarínicos (PORTO et al. 2008). Em tecido prostático, o EGFr foi identificado em ratos (JACOBS & STORY, 1988) e suínos (OLIVA-HERNANDEZ & PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008).

No componente estromal dos fragmentos avaliados, o EGFr esteve presente em maior destaque nas fibras musculares lisas e fibroblasto. No diagnóstico normal, igualmente ao TGF- α , não houve imunorreatividade que destacasse algum componente estromal. O fato de ter sido encontrado nestes locais está de acordo com os achados já descritos para o EGF e TGF- α , uma vez que o EGFr é receptor comum aos dois fatores de crescimento, e essas estruturas do componente estromal também apresentaram uma imunorreatividade marcante para o EGF e TGF- α .

No componente epitelial acinar todos os fragmentos avaliados apresentaram imunorreatividade no núcleo. Esse fator de crescimento foi identificado no citoplasma da glândula prostática de suínos (OLIVA-HERNANDEZ & PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008). Foram identificadas no núcleo das células das glândulas endometriais de cadela na fase de proestro (TAMADA et al., 2005) e nas glândulas endometriais de cadelas saudáveis e acometidas por CHEC (IGLESIAS-NUÑEZ et al., 2008). A localização nuclear do EGFr, bem como alguns de seus ligantes, está relacionado ao estado de proliferação dos tecidos, além do potencial papel de transcrição ou co-ativador de genes necessários para seus efeitos mitogênicos (LIN et al., 2001).

Igualmente já comentado nos demais anticorpos utilizados, o EGFr foi avaliado nos diferentes grupos de HPB quanto a intensidade e fração de área tingida frente aos

dados do diagnóstico normal, e após análise dos valores (Tabela 7), verificou-se que não houve diferenças significativas entre os diagnósticos avaliados.

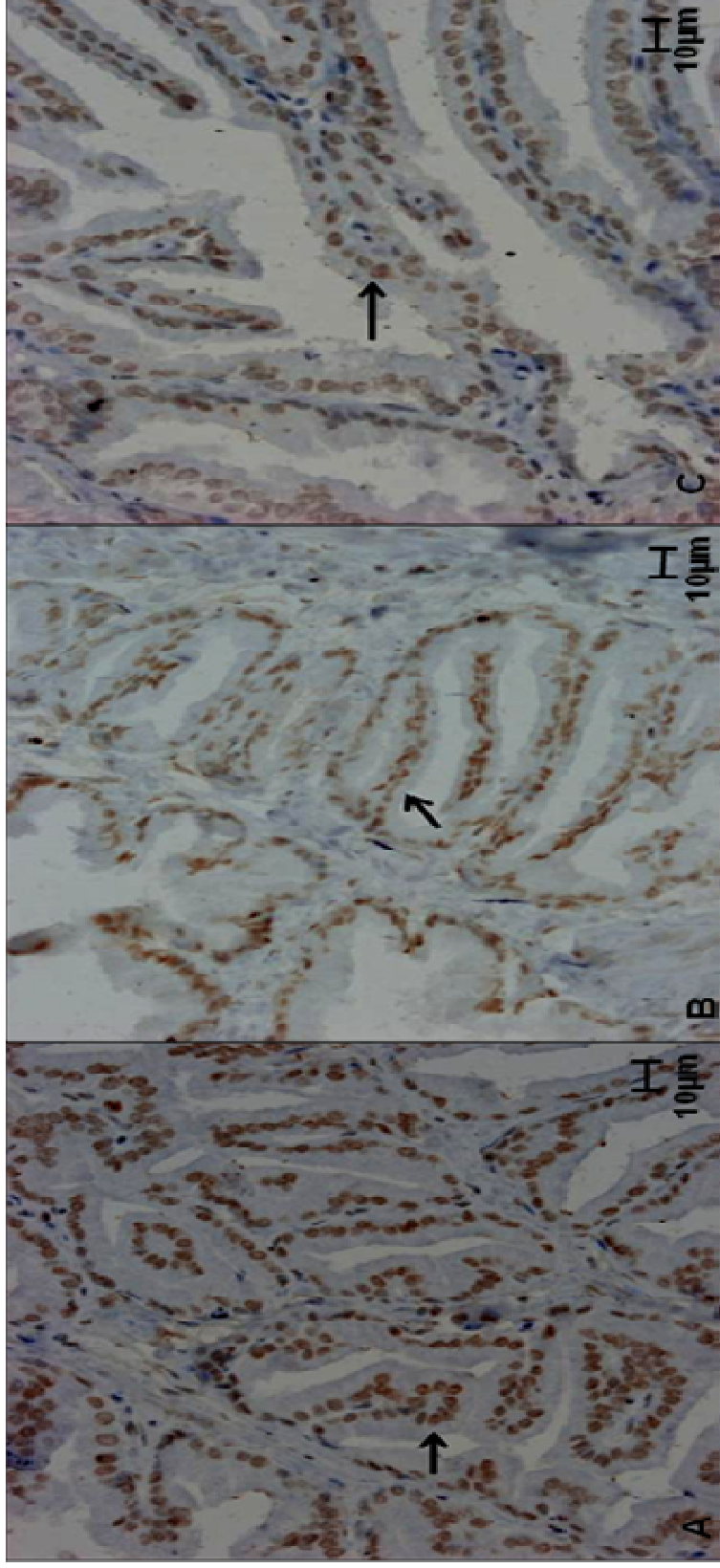


Figura 13 – Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino normal (A), HPB-ep (B) e HPB-e (C), marcado com a proteína EGFr, evidenciando na seta: componente epitelial, método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.

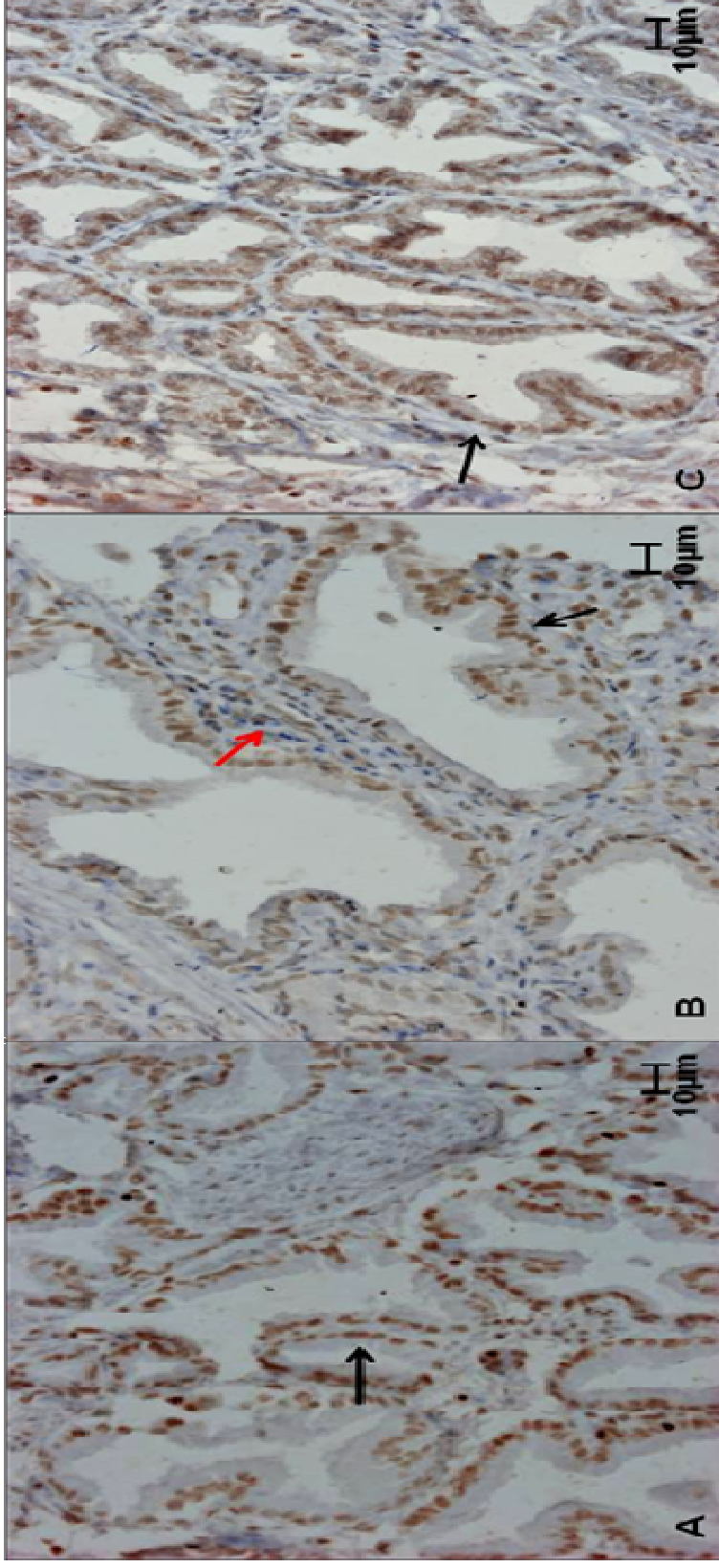


Figura 14 – Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino com diagnóstico de CHIPB (A), prostatite (B) e displasia (C), marcado com a proteína EGFr, evidenciando nas setas: componente estromal (vermelha) e componente epitelial (preta), método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.

5.3.13 Avaliação da proteína p-ERK1/2 nas diferentes classificações de HPB versus N

Todos os fragmentos com diferentes classificações de HPB e N apresentaram marcação positiva para a proteína p-ERK1/2 e os componentes estromal e epitelial acinar também tiveram marcação positiva (Figuras 15A, 15B, 15C e 16A). No Quadro 17 estão descritos os componentes estromais e epiteliais que apresentaram forte marcação em cada diagnóstico avaliado.

Quadro 17 – Componentes estromais e epiteliais acinar que apresentaram maior destaque na marcação para a p-ERK1/2 em fragmentos prostáticos de cão classificados como normais e com diferentes graus de hiperplasia prostática benigna (HPB)

Proteína	Diagnósticos							
	Normal		HPB-ep		HPB-e		CHPB	
	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel
p-ERK1/2	FML, F	núcleo	FML	núcleo	FML, F	núcleo	FML, CE	núcleo

Na Tabela 8 são apresentados os valores de intensidade e área tingida obtidos após análise pelo *software*.

Tabela 8- Médias±erro padrão da média para intensidade da marcação e área tingida com a proteína p-ERK1/2 em fragmentos de próstata de cão

p-ERK 1/2			
DA das próstatas	Nº de fragmentos	Valor médio de intensidade	Valor médio de área tingida (%)
N	5	1895±657	6,600±2,562
HPB-ep	6	2682±686	12,299±2,485
HPB-e	6	3181±689	15,644±2,062
CHPB	6	2431±376	9,952±1,353

Nos parâmetros avaliados não houve diferença estatística entre os diagnósticos marcados com a proteína p-ERK1/2.

5.3.14 Avaliação da proteína p-ERK1/2 nas diferentes classificações de P versus N

Todos os fragmentos normais e com prostatite avaliados no estudo apresentaram marcação positiva para a proteína p-ERK 1/2 e os componentes estromal e epitelial acinar também tiveram marcação positiva (Figura 16B). No Quadro 18 estão descritos os componentes estromais e epiteliais que apresentaram marcação mais evidente em cada diagnóstico avaliado.

Quadro 18 – Componentes estromais e epiteliais que apresentaram maior marcação para a proteína p-ERK1/2 nos fragmentos prostáticos caninos normais e com prostatite

Proteína	Diagnósticos			
	Normal		Prostatite	
	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel
p-ERK1/2	FML, F	núcleo	FML, F	núcleo

5.3.15 Avaliação da proteína p-ERK1/2 nas diferentes classificações de Displasia ou PIN versus N.

Todos os fragmentos normais e com displasia ou PIN avaliados no estudo apresentaram marcação positiva para a proteína p-ERK 1/2 e os componentes estromal e epitelial acinar também tiveram marcação positiva (Figura 16C). No Quadro 19 estão descritos os componentes estromais e epiteliais que apresentaram marcação mais evidente em cada diagnóstico avaliado.

Quadro 19 – Componentes estromais e epiteliais que apresentaram maior marcação para a proteína p-ERK1/2 nos fragmentos prostáticos caninos normais e com displasia ou PIN

Proteína	Diagnósticos			
	Normal		Displasia ou PIN	
	C. estr	C. epitel	C. estr	C. epitel
p-ERK1/2	FML, F	núcleo	FML, F	núcleo

A utilização do anticorpo anti-p-ERK 1/2 nos fragmentos prostáticos de cães, mostrou-se efetivo, já que houve marcação nos componentes estromal e epitelial em cada diagnóstico avaliado. A mesma proteína foi utilizada em tecidos caninos como rins (LI et al., 2004), trato gastrointestinal (STEPAN et al., 2004), sistema respiratório (BONGALON et al., 2004) e cardiovascular (KOIKE et al., 2004). A utilização deste anticorpo já havia sido bem sucedida em estudos com próstatas caninas diagnosticadas com displasia ou PIN, prostatite, HPB-ep e HPB-e (OLIVEIRA, 2005).

No componente estromal dos fragmentos avaliados, o p-ERK 1/2 esteve presente em maior destaque nas fibras musculares lisas e fibroblasto. Sabe-se que tanto as fibras musculares lisas quanto os fibroblastos estão envolvidos na síntese da MEC, o que facilita a comunicação entre células, estão envolvidos também com a produção de colágeno e elastina que auxiliam na regeneração tecidual e mantem um meio ideal para transmissão de sinais entre uma célula e outra e entre estruturas dentro da mesma célula. As fibras musculares lisas estão envolvidas no processo de contração de órgãos e os fibroblastos em processos como regeneração tecidual. A proteína ERK1/2 está envolvida em diversos eventos celulares, dentre eles a proliferação celular, integração de sinais dentro e entre as células, apoptose, transcrição de genes, diferenciação celular, plasticidade neuronal, entre outras funções (LENZ, 2000).

No componente epitelial acinar todos os fragmentos avaliados apresentaram imunorreatividade no núcleo. Esse achado está de acordo com uma das principais funções da proteína ERK1/2 que é a ativação via fosforilação de proteínas efetoras presentes no núcleo das células que são capazes de codificar o estímulo recebido promovendo a ação esperada, seja ela transcrição genética, produção de proteína, sinalização para um novo ciclo celular, diferenciação e desenvolvimento tecidual e início do processo de apoptose.

A proteína p-ERK1/2 foi avaliada nos diferentes grupos de HPB quanto a intensidade e fração de área tingida frente aos dados do diagnóstico normal, e após análise dos valores (Tabela 8), verificou-se que não houve diferenças significativas entre os diagnósticos avaliados.

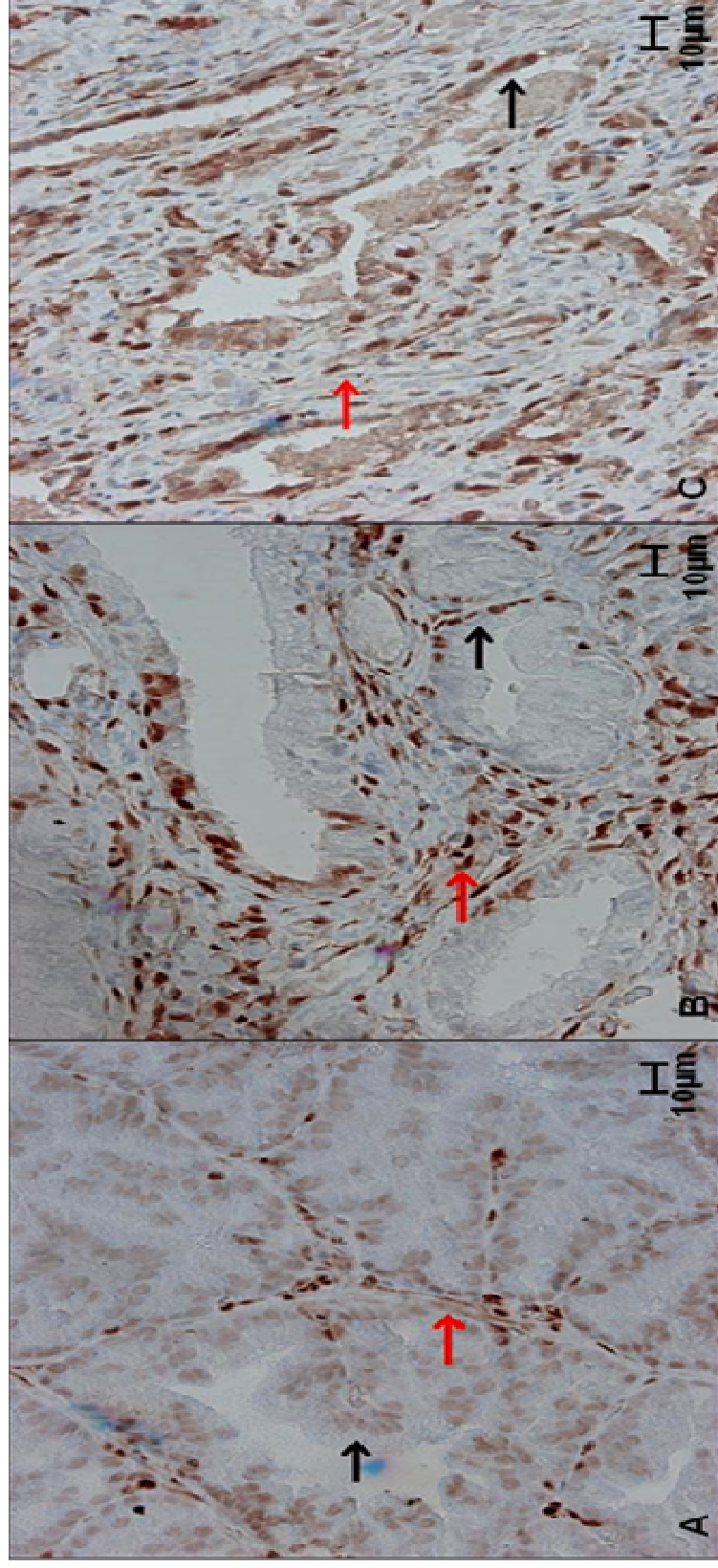


Figura 15 – Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino normal (A), HPB-ep (B) e HPB-e (C), marcado com a proteína p-ERK 1/2, evidenciando nas setas: componente estromal (vermelha) e componente epitelial (preta), método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.

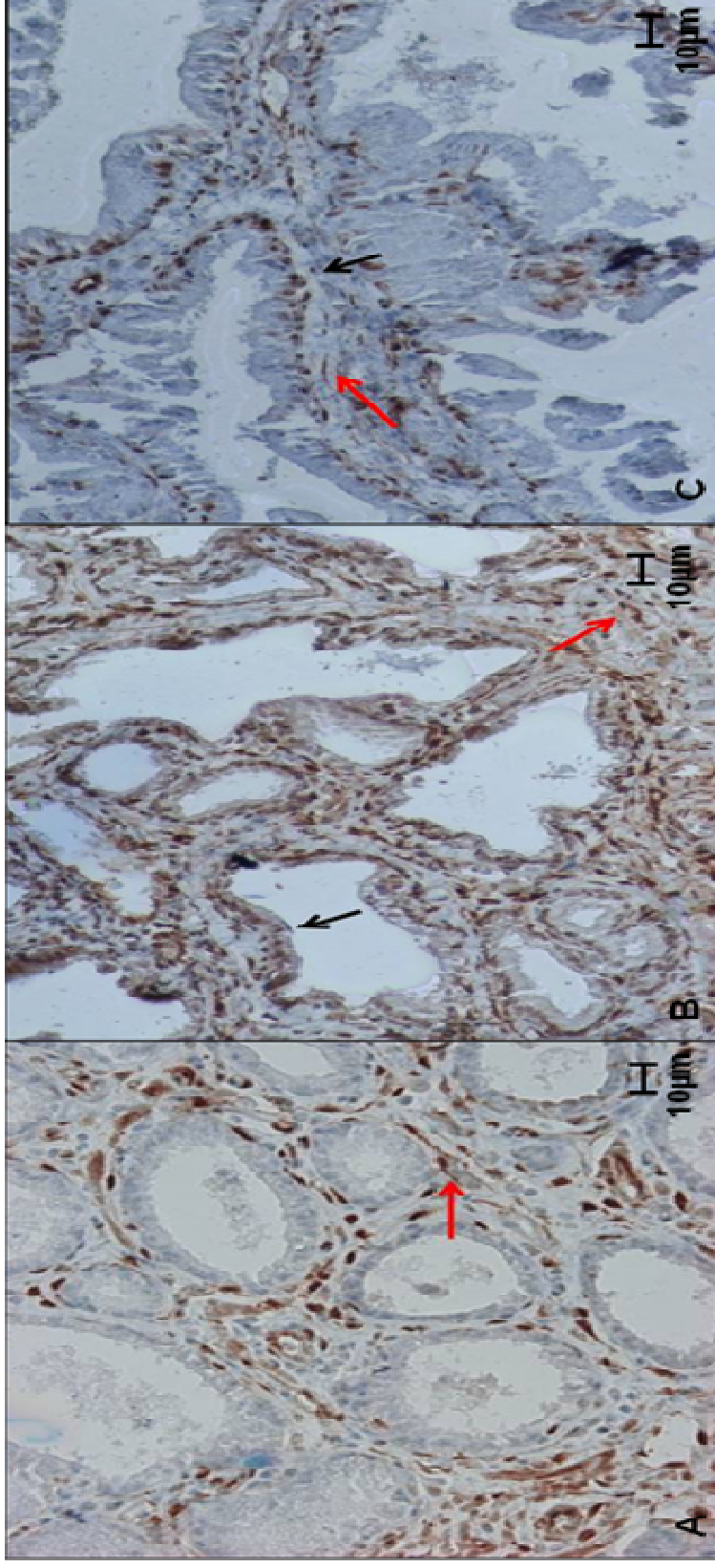


Figura 16 – Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido prostático canino com diagnóstico de CHIPB (A), prostatite (B) e displasia (C), marcado com a proteína p-ERK 1/2, evidenciando nas setas: componente estromal (vermelha) e componente epitelial (preta), método ABC, contra corados com Hematoxilina de Harris, obj. 40x.

5.4 Correlação entre as intensidades das proteínas e fatores de crescimento com os fragmentos de próstatas normais e com diferentes classificações de HPB.

Para maior entendimento da rota de transdução de sinal proposta neste estudo, foi realizado o teste de Correlação de Pearson, com a finalidade de avaliar a existência de interação entre as diferentes proteínas e as classificações de HPB avaliadas no quesito intensidade.

A Figura 1 propõe uma interação entre todas as proteínas e fatores de crescimento aplicados nos fragmentos de próstatas caninas avaliados neste estudo, seria lógico que a medida que a alteração prostática fosse se agravando do ponto de vista histopatológico, as proteínas extracelulares ou sinalizadoras (*CYR61*, EGF e TGF- α) se comportassem de maneira semelhante quanto a intensidade e/ou a área tingida das proteínas mensageiras (EGFr e p-ERK1/2) para tanto foi realizado um teste de Correlação de Pearson entre os diferentes diagnósticos de HPB encontrados versus os fragmentos sem alteração.

Nos fragmentos normais houve correlação positiva e acima de 50% com o EGF x EGFr ($r=0,68$; $p\geq 0,19$) e o TGF- α x EGFr ($r=0,80$; $p\geq 0,10$), o que era esperado, já que o EGFr é o receptor padrão do EGF e TGF- α (CARPENTER & COHEN, 1979). Nas avaliações houve correlação positiva e acima de 50% entre o EGF x p-ERK1/2 ($r=0,81$; $p\geq 0,09$). Em estudos com células de placenta humana, a adição de EGF levou uma super ativação da p-ERK1/2 e PI3K (QIU et al., 2004), o que confirma uma interação entre as proteínas encontradas nos fragmentos prostáticos avaliados neste estudo.

No diagnóstico de HPB-ep houve correlação positiva e acima de 50% com as proteínas *CYR61* x EGF ($r=0,51$; $p\geq 0,29$), que pela disposição demonstrada na Figura 1 não teriam relação alguma, porém GASHOW et al. (2006) estimulando células endometriais com EGF observaram uma super e rápida expressão da proteína *CYR61* nas células estudadas, o que corrobora os resultados das análises realizadas nos fragmentos prostáticos caninos.

No diagnóstico HPB-e houve correlação positiva e acima de 50% entre *CYR61* x TGF- α ($r=0,86$; $p\leq 0,02$), considerada significativa já que teve $p\leq 0,02$, que também não

teria relação alguma segundo a Figura 1, porém sabe-se do poder angiogênico das duas proteínas e da semelhança estrutural e funcional dos membros da Família EGF (CARPENTER & COHEN, 1979), e acredita-se que esta seja a explicação para a correlação positiva encontrada entre essas proteínas neste diagnóstico. Houve correlação positiva e acima de 50% no TGF- α x p-ERK 1/2 ($r=0,64$; $p\geq 0,16$) que sugere interação entre proteína sinalizadora com proteína mensageira. Houve também uma correlação negativa considerada significativa ($p\leq 0,01$) entre as proteínas EGF x p-EKR1/2 ($r= -0,89$; $p\leq 0,01$).

No diagnóstico CHPB houve correlação positiva e acima de 50% entre as proteínas *CYR61* x TGF- α ($r=0,58$; $p\geq 0,22$) e entre EGF x EGFr ($r=0,64$; $p\geq 0,16$)., ambas combinações e explicações já descritas anteriormente.

5.5 Avaliação Western Blotting (W.B.)

5.5.1 Avaliação do CYR61

O W.B. da proteína *CYR61*, nos diferentes fragmentos, apresentou uma banda definida de pesos moleculares descritos no Quadro 20 para cada diagnóstico, a amostra normal não apresentou banda visível na quantidade de 50 μ g de proteína colocadas em cada poço do gel de poli-acrilamida SDS-PAGE 10%.

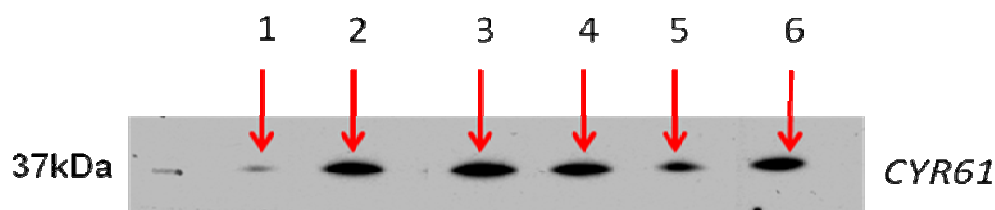


Figura 17 - Imagem radiográfica escaneada da banda da proteína *CYR61*, bem como o marcador molecular, detectada por quimiluminescência, em próstatas de cães com prostatite (1), HPB-ep (2), HPB-e (3), CHPB (4) e displasia (5) e útero hígido de cadelas (6).

Quadro 20 – Peso molecular (kDa) da proteína *CYR61* nos fragmentos prostáticos analisados por Western Blotting

Diagnóstico	Prostatite	HPB-ep	HPB-e	CHPB	Displasia	Útero	Média
<i>CYR61</i> (kDa)	37,56	37,56	37,37	37,43	37,93	38,44	37,72

A proteína *CYR61*, neste estudo, apresentou peso molecular médio de 37,72 kDa, porém não foi possível verificar sua presença em todos os ensaios. Segundo informações técnicas de anti-*CYR61* (NovusBio, NB100-357, CO, USA), similar ao utilizado neste estudo, este anticorpo quando usado para W.B., pode apresentar três bandas com valores 25 kDa e 37 kDa, consideradas estruturas desnaturantes (clivadas) da proteína, e outra de 45 kDa que é a forma íntegra. Segundo dados disponíveis no GenBank, a proteína pró-*CYR61* no cão tem peso molecular de 41,64 kDa. Dados semelhantes, em estudos prostáticos caninos, não foram encontrados na literatura para comparação e discussão.

5.5.2 Avaliação do EGF

O W.B. do fator de crescimento EGF apresentou duas bandas definidas de pesos moleculares descritos no Quadro 21, a amostra do controle positivo não apresentou banda visível na quantidade de 50µg de proteína colocadas em cada poço do gel de poli-acrilamida SDS-PAGE 10%.

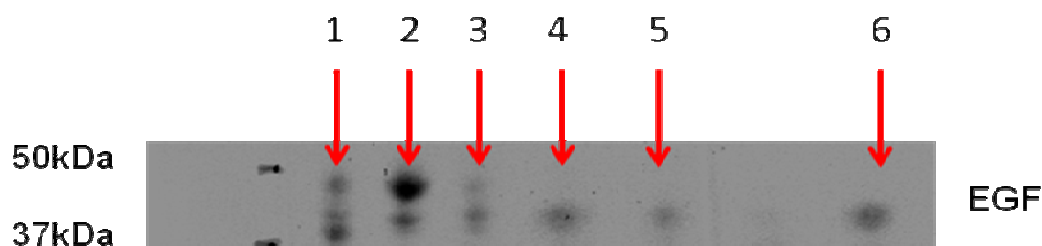


Figura 18 - Imagem radiográfica escaneada da banda da proteína EGF, bem como o marcador molecular, detectada por quimiluminescência, em próstatas normais (1), prostatite (2), HPB-ep (3), HPB-e (4), CHPB (5) e displasia (6).

Quadro 21 – Peso molecular (kDa) da proteína EGF nos fragmentos prostáticos analisados por Western Blotting

Diagnóstico	Normal	Prostatite	HPB-ep	HPB-e	CHPB	Displasia	Média
EGF (kDa)	46,76	46,15	47,44	47,31	47,50	-----	47,03
	41,38	40,83	41,48	41,76	42,20	42,25	41,65

O fator de crescimento EGF apresentou, nos fragmentos prostáticos caninos estudados, duas bandas com média de peso molecular de 47,03 kDa e 41,65 kDa e igualmente ao *CYR61*, as bandas não estavam presentes em todos os diagnósticos avaliados. Segundo dados descritos no GenBank o peso molecular da proteína pró-EGF no cão é de 134,29 kDa. Em estudos com o pró-EGF e EGF derivados de cultivo de células renais e urina de ratos, encontraram que o pró-EGF origina duas formas reativas do EGF, uma com baixo peso molecular (6 kDa) e outra de médio peso molecular (45 kDa), supõe-se ainda, que a forma de 45 kDa, é uma forma intermediária entre o pró-EGF e o EGF de 6 kDa (JOURNE et al., 1997). Com isso acredita-se que os pesos moleculares encontrados neste estudo com fragmentos prostáticos caninos e o fator de crescimento EGF sejam forma intermediária da proteína como descrito anteriormente.

5.5.3 Avaliação do TGF- α

O W.B. do fator de crescimento TGF- α apresentou duas bandas definidas, em alguns diagnósticos, de pesos moleculares descritos no Quadro 22, na quantidade de 50 μ g de proteína colocadas em cada poço do gel de poli-acrilamida SDS-PAGE 10%.

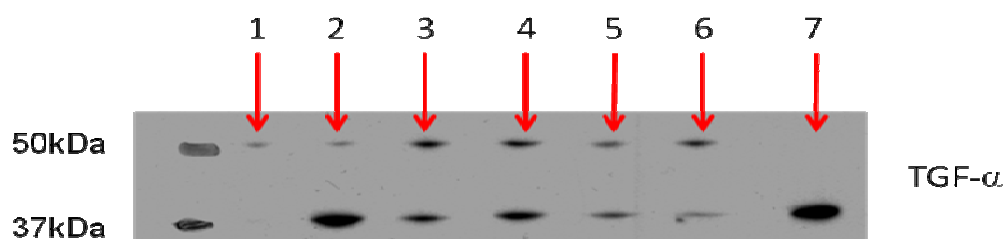


Figura 19 - Imagem radiográfica escaneada da banda da proteína TGF- α , bem como o marcador molecular, detectada por quimiluminescência, em próstatas normais (1), prostatite (2), HPB-ep (3), HPB-e (4), CHPB (5), displasia (6) e útero (7).

Quadro 22 – Peso molecular (kDa) da proteína TGF- α nos fragmentos prostáticos analisados por Western Blotting e valor médio.

Diagnóstico	Normal	Prostatite	HPB-ep	HPB-e	CHPB	Displasia	útero	Média
TGF- α (kDa)	51,22	51,94	52,33	52,24	53,79	51,87	----	52,23
	----	38,21	38,63	38,81	39,55	38,12	39,98	38,88

O TGF- α apresentou duas bandas, e semelhante aos dois anteriores, nem todos os diagnósticos apresentaram as bandas visíveis ao raio-X. A média dos pesos moleculares das bandas variou de 52,23 e 38,88 kDa. Em estudo de acompanhamento da secreção de TGF- α pelos macrófagos alveolares de coelhos em idades variando de zero dias até quatro meses de idade, encontraram-se três isoformas de TGF- α com pesos moleculares médios de 46, 30 e 14,3 kDa (WAGNER et al., 1995). Em outro estudo envolvendo cultivo de células epiteliais humanas foi encontrado outras três isoformas do TGF- α com pesos moleculares 16, 25 e 36 kDa (LI et al., 2004). Segundo consta no GenBank, o pró- TGF- α do cão tem peso molecular de 49,19 kDa. Os valores encontrados neste estudo diferem dos valores observados na literatura, uma explicação lógica seria a diferença das espécies estudadas e o grau de alteração tecidual, visto que na literatura consultada, as amostras são tecidos em desenvolvimento ou cultivo celular.

5.5.4 Avaliação do EGFr

O W.B. da proteína EGFr apresentou uma banda definida de peso molecular de pesos moleculares descritos no Quadro 23, na quantidade de 50 μ g de proteína colocadas em cada poço do gel de poli-acrilamida SDS-PAGE 10%.

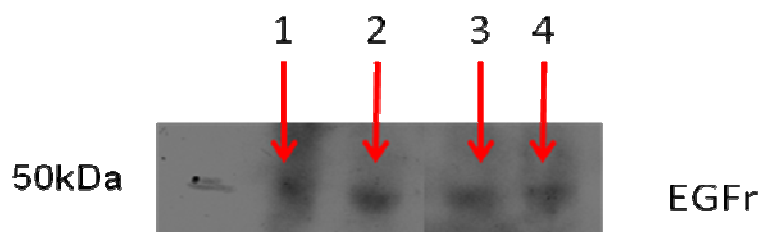


Figura 20 - Imagem radiográfica escaneada da banda da proteína EGFr, bem como o marcador molecular, detectada por quimiluminescência, em próstatas normais (1), prostatite (2), HPB-e (3), CHPB (4).

Quadro 23 – Peso molecular (kDa) da proteína EGFr nos fragmentos prostáticos analisados por Western Blotting e valor médio.

Diagnóstico	Normal	Prostatite	HPB-ep	HPB-e	CHPB	Displasia	Média
EGFr (kDa)	49,08	47,74	----	47,99	49,15	----	48,49

O receptor de membrana EGFr apresentou uma banda definida nas amostras avaliadas e o peso molecular médio foi de 48,49 kDa. Em estudos com placenta humana, foram identificados duas isoformas do receptor EGFr de 170 kDa com pesos moleculares de 60 e 110 kDa, onde a segunda foi comprovadamente vinculada a superfície das células e acredita-se ser um excelente indicador de progressão de doenças envolvidas no desenvolvimento placentário (REITHER & MAIHLE, 2003). O GenBank refere-se ao pró-EGFr de cães com 175,41 kDa de peso molecular. Neste estudo encontrou-se um peso molecular abaixo do achado na literatura o que sugere que mais estudos nesta área devem ser realizados com a finalidade de entendimento dessa isoforma em próstatas de cães.

5.5.5 Avaliação do p-ERK 1/2

O W.B. da proteína p-ERK 1/2 apresentou três bandas definidas de pesos moleculares médios descritos no Quadro 24, na quantidade de 50µg de proteína colocadas em cada poço do gel de poli-acrilamida SDS-PAGE 10%.

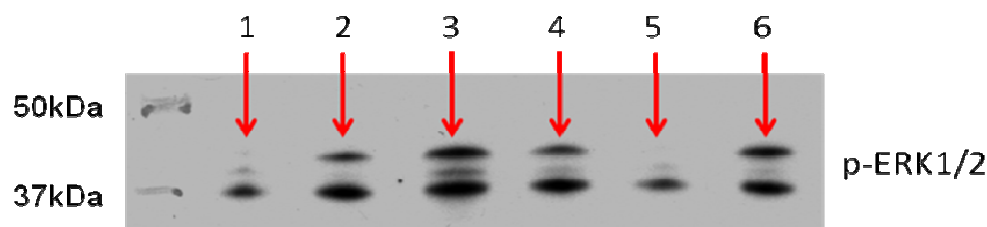


Figura 21 - Imagem radiográfica escaneada da banda da proteína EGF, bem como o marcador molecular, detectada por quimiluminescência, em próstatas com prostatite (1), HPB-ep (2), HPB-e (3), CHPB (4), displasia (5) e útero (6).

Quadro 24 – Peso molecular (kDa) da proteína p-ERK1/2 nos fragmentos prostáticos analisados por Western Blotting e valor médio.

Diagnóstico	Prostatite	HPB-ep	HPB-e	CHPB	Displasia	Útero	Média
p-ERK 1/2 (kDa)	----	42,74	42,37	42,82	----	42,50	42,61
	----	----	39,65	39,47	----	----	39,56
	36,87	36,79	37,22	37,62	37,79	37,28	37,26

O W.B. da proteína p-ERK 1/2 em fragmentos de próstatas de cães apresentou três bandas, igualmente comentado para as outras proteínas, essa proteína não apresentou banda visível em todos os diagnósticos estudados. A média dos pesos moleculares encontrados foi de 42,61; 39,56 e 37,26 kDa. Segundo dados do GenBank a proteína p-ERK 1 e p-ERK 2 tem como pesos moleculares em cães 41,26 e 42,75 kDa respectivamente. Não foram encontrados dados na literatura referente a esses achados que pudessem servir para comparação e discussão.

6 CONCLUSÃO

Pelo presente estudo podemos concluir que:

- 1) Os fragmentos prostáticos com diferentes diagnósticos histológicos tiveram imunorreação positiva nos componentes estromais e epiteliais com as proteínas *CYR61*, EGF, TGF- α , EGFr e p-ERK 1/2.
- 2) O método de quantificação da imunorreação dos fragmentos classificados como normais e com diferentes graus de HPB, por meio do exame imunoistoquímico e auxiliado pelo “software Image J 1.40”, mostrou-se de utilização viável, já que a avaliação realizada resultou em dados de intensidade da imunorreação e fração da área tingida, o que permitiu comparação com demais dados obtidos.
- 3) A correlação realizada entre as proteínas estudadas e os diagnósticos normais e os diferentes graus de HPB foi possível e confirmou a existência de interação entre as proteínas estudadas.
- 4) O exame de Western Blotting mostrou-se efetivo na detecção e determinação do peso molecular das proteínas *CYR61* e p-ERK1/2 e os fatores de crescimento EGF, TGF- α e EGFr em lisado de tecido prostático canino normal e acometido por diversas alterações.

7 REFERÊNCIAS

- AARONSON, S. A. Growth factors and cancer. *Science*. v. 254, n. 5055, p. 1146-53, 1991.
- ANDERSON, N. G., MAILER, J. L, TONKS, N. K., STURGILL, T. W. Requirements for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP Kinase. *Nature*, v. 343, p. 651-653, 1990.
- AQUILINA, J. W.; MCKINNEY, L.; PACELLI, A.; RICHMAN, L. K.; WATERS, D. J.; THOMPSON, I.; BURGHARDT, W. F. JR, BOSTWICK. D. G.; High grade prostatic intraepithelial neoplasia in military working dogs with and without prostate cancer. *Prostate*, New York, v. 36, p. 189-93, 1998.
- ARAUJO, E. G.; BIANCHI, C.; SATO, K.; LI, X. A., SELLKE, F. W. Inactivation of the MEK/ERK pathway in the myocardium during cardiopulmonary bypass. *Journal of Thoracic and cardiovascular surgery*, v.121, n.4, p. 773-781, 2001.
- ATALAN, G., HOLT, P. E., BARR, F. J., BROWN, P. J. Ultrasonografic estimation of prostatic size in canine cadavers. *Research in veterinary science*, v. 67, p. 7-15, 1999.
- BABIC, A. M., CHEN, C. C., LAU, L. F. Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Molecular and Cellular Biology*, v. 19, n. 4, p. 2958-66, 1999.
- BABIC, A. M., KIREEVA, M. L., KOLESNIKOVA, T. V., LAU, L. F. *CYR61*, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 11, p. 6355-60, 1998.
- BAMBERG-THALÉN, B., LINDE-FORSBERG, C. The effects of medroxyprogesterone acetate and ethinylestradiol on hemogram, prostate, testes and semen quality in normal dogs. *J. vet. Med. Assoc*, v.39, n. 4, p. 264-270, 1992.

BARSANTI, J. A., FINCO, D. R. Evaluation techniques for diagnosis of canine prostatic disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 185, n. 2, p.198-200, 1989.

BARSANTI, J.A., FINCO, D.R. Canine prostatic disease. In: MORROW, D.A. *Current therapy in theriogenology II*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986.

BONGALON, S., DAI, Y. P., SINGER, C. A., YAMBOLIEV, I. A. PDGF and IL-1beta upregulate cofilin and LIMK2 in canine cultured pulmonary artery smooth muscle cells. *Journal of Vascular Research*, v. 41, n. 5, p. 412-21, 2004.

BOONSTRA, J., RIJKEN, P., HUMBEL, B., CREMERS, F., VERKLEIJ, A., VAN BERGEN, E. N., HENEGOUWEN, P. The epidermal growth factor. *Cell Biology International*, v.19, n. 5, p. 413-30, 1995

BOULOUGOURIS, P., ELDER, J. Epidermal growth factor receptor structure, regulation, mitogenic signalling and effects of activation. *Anticancer Res*, v. 21, n. 4A, p. 2769-2776, 2001.

BRIGSTOCK, D. R. The CCN family: a new stimulus package. *Journal Endocrinology*, v. 178, n. 2, p. 169-75, 2003.

BRIGSTOCK, D. R. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr Rev*, v. 20, n. 2, p.189-206, 1999.

CARPENTER, G., COHEN, S. Epidermal growth factor. *Annual Review of Biochemistry*, v. 48, p. 193-216, 1979.

CARPENTER, G., COHEN, S. Epidermal Growth Factor. *Journal of Biological Chemistry*, v. 265, n. 14, p. 7709-7712, 1990.

CATTERTON, W. Z., ESCOBEDO, M. B., SEXSON, W. R., GRAY, M. E., SUNDELL, H. W., STAHLMAN, M. T. Effect of epidermal growth factor on lung maturation in fetal rabbits. *Pediatric Research*, v. 13, n. 2, 104-108, 1979.

CHEN, M. C., LEE, A. T., KARNES, W. E., AVEDIAN, D., MARTIN, M., SORVILLO, J. M., SOLL A. H. Paracrine control of gastric epithelial cell growth in culture by

transforming growth factor-alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v. 264, n. 2, 390-396, 1993.

CHEW, D. J. An overview of prostatic disease. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, v. 19, p.80-5, 1997.

CHUNG, K. C., AHN, Y. S. Expression of immediate early gene *CYR61* during the differentiation of immortalized embryonic hippocampal neuronal cells. *Neuroscience Letters*, v. 255, n. 3, p. 155-8, 1998.

COTRAN, R. S. neoplasia. In: COTRAN, R. S., KUMAR, V., ROBBINS, C. *Pathological basis of disease*. 6ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999. cap.6, p.260-328.

COUNTAWAY, J. L., MCQUILKIN, P., GIRONES, N., DAVIS, R. J. Multisite phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. Use of site-directed mutagenesis to examine the role of serine/threonine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 265, n. 6, p. 3407-16, 1990.

DE MIGUEL, M. P., ROYUELA, M., BETHENCOURT, F. R., RUIZ, A., FRAILE, B., PANIAGUA, R. Immunohistochemical comparative analysis of transforming growth factor α , epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in normal, hyperplastic and neoplastic human prostates. *Cytokine*, v. 11, n. 9, p. 722–727, 1999.

DEMPSEY, P. J. e COFFEY, R. J. Basolateral targeting and efficient consumption of transforming growth factor-alpha when expressed in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem*, v. 269, n. 24, 16878-16889, 1994.

DI SANTIS, G. W. Estudo morfológico, morfométrico e imunoistoquímico de próstatas caninas normais e hiperplásicas. 2003. 118 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, *Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"*, Botucatu.

DORFMAN, M., BARSANTI. J. Diseases of the canine prostatic gland. *Comp. Cont. Educ.*, v. 17, n. 6, p. 791-811, 1995.

- EL-RAYES, B. F., LORUSSO, P. M. Targeting the epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer*, v. 91, n. 3, p. 418-424, 2004.
- ENGLISH, P. R., BURGESS, G., SEGUNDO, R., DUNNE, J. Stockmanship: improving the care of the pig and other livestock. *Farming Press Books*, Wharfedale Road, Ipswich, UK, p. 190. 1992.
- FELDMAN, E. C., NELSON, R. W. Prostatitis. In: FELDMAN, E. C., NELSON, R. W. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 2ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996, p. 673-690.
- FINKBEINER, S., GREENBERG, M. E. Ca(2+)-dependent routes to Ras: mechanisms for neuronal survival, differentiation, and plasticity? *Neuron*, v. 16, n. 2, p. 233-6, 1996.
- GAN, B. S., MACCANNELL, K. L., HOLLENBERG, M. D. Epidermal Growth Factor-Urogastrone Causes Vasodilatation in the Anesthetized Dog. *J. Clin. Invest.*, v. 80, p. 199-206, 1987.
- GARDNER, A. M., JOHNSON, G. L. Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 24, p. 14560-6, 1996.
- GASHAW, I., STILLER, S., BÖING, C., KIMMIG, R., WINTERHAGER, E. Cyclic changes of CYR61 (CCN1) expression in human endometrium and its regulation properties in endometrial cell lines. *Fertility and Sterility*, v. 86, n. 3, Suppl.1, pp.S277-S278, 2006.
- GORMAN, N. T. Diagnosis and management of canine prostatic disease. In: BAINBRIDGE, J., ELLIOTT, J. *Manual of canine and feline nephrology and urology*. BSAVA, p175-85, 1996.
- GRIFFITHS, K. EATON, C. L.; HARPER, M. E.; PEELING, B.; DAVIES, P. Steroid hormones and the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Eur. Urol.*, v. 20, suppl. 1, p. 68-77, 1991.

GROENEN, L. C., NICE, E. C., BURGUESS, A. W. Structure-function relationships for the EGF/TGF α family of mitogens. *Growth factors*, v. 11, p. 235-57, 1994.

GUPTA, S., CAMPBELL, D., DERIJARD, B., DAVIS, R. J. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*, v. 267, n. 5196, p. 389-93, 1995.

HELDI, C. H. SH2 domains: elements that control protein interactions during signal transduction. *Trends in Biochemycal Sciences*, v. 16, n. 12, p. 450-2, 1991.

HILFIKER, A., HILFIKER-KLEINER, D., FUCHS, M., KAMINSKI, K., LICHTENBERG, A., ROTHKOTTER, H. J., SCHIEFFER, B., DREXLER, H. Expression of *CYR61*, an angiogenic immediate early gene, in arteriosclerosis and its regulation by angiotensin II. *Circulation*, v. 106, n. 2, p. 254-60, 2002.

HINKLE, C. L., MOHAN, M. J., LIN, P., YEUNG, N., RASMUSSEN, F., MILLA, M. E., MOSS, M. L. Multiple metalloproteinases process protransforming growth factor- α (ProTGF- α). *Biochemistry*, v. 42, n. 7, p. 2127-2136, 2003.

HUS, S. M., RAINE, L., FANGER, H. Use avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981.

IGLESIAS-NÚÑEZ, M., SOUSA-OLIVEIRA, K., OLIVA-HERNÁNDEZ, J., RODRÍGUEZ-BERTOS, A., HÉLIO TONIOLLO, G., PÉREZ-GUTIÉRREZ, J. F. Immunohistochemical Study of the Epidermal Growth Factor, Transforming Growth Factor Alpha and the Epidermal Growth Factor Receptor in the Cystic-Endometrial-Hyperplasia-Pyometra Complex in the Bitch. *Reproduction in domestical animals*, v. 43, suppl. 4, p. 80, 2008.

IMAI, Y. Epidermal growth factor in rat uterine luminal fluid. In: *Program of the 64th annual meeting of The Endocrine Society*, p. 331, 1982.

IMPEY, S., OBRIETAN, K., STORM, D. R. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron*, v. 23, n. 1, p. 11-14, 1999.

JACOBS, S. C., STORY, M. T. Exocrine secretion of epidermal growth factor by the rat prostate: Effect of adrenergic agents, cholinergic agents, and vasoactive intestinal peptide. *Prostate*, v. 13, n. 1, p. 79-87, 1988.

JEDSADAYANMATA, A., CHEN, C. C., KIREEVA, M. L., LAU, L. F., LAM, S. C. Activation-dependent adhesion of human platelets to *CYR61* and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 34, p. 24321-7, 1999.

JOHNSTON, S. D., KAMOLPATANA, K., ROOT-KUSTRITZ, M. V., JOHNSTON, G. R. prostatic disorders in the dog. *Animal reproduction science*. v. 60-61, p. 24321-7405-415, 2000.

JOURNE, F., WATTIEZ, R., PIRON, A., CARION, M., LAURENT, G., HEUSON-STIENNON, J-A., FALMAGNE, P. Renal epidermal growth factor precursor: proteolytic processing in an in vitro cell-free system. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1357, n. 1, p. 18-30, 1997.

KARIN, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B. Biol Sci*, v. 351, n. 1336, p. 127-34, 1996.

KARR, J. F., KANTOR, J. A., HAND, P. H., EGGENSPERGER, D.L., SCHLOM, J. 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, n. jun. 1, p. 2455-62, 1995.

KASSELBERG, A. G., ORTH, D. N., GRAY, M. E., STAHLMAN, M. T. Immunocytochemical lcalization of human epidermal growth factor/urogastrone in several human tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 33, n. 4, p. 315-322, 1985.

KAY, N. D. Prostatopatias. In: BIRCHARD, S. J., SHERDING, R. G. *Manual Saunders - Clínica de Pequenos Animais*. 2.ed. São Paulo: 2003, p.1083-1091.

- KAY, N. D., LING, G. V., NYLAND, T. G., KENNEDY, P. C., ZINKL, J. G. Cytological Diagnosis of canine prostatic disease using a urethral brush technique. *The Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 25, n. 5, p. 517-26, 1989.
- KERKHOFF, E., RAPP, U. R. Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene*, v. 17, n. 11, p. 1457-62, 1998.
- KIREEVA, M. L. *CYR61* and FISP 12 are both ECM-associated signaling molecules: Activities, metabolism, and localization during development. *Experimental Cell Research*, v. 233, n. 1, p. 63-77, 1997.
- KIREEVA, M. L., MO, F. E., YANG, G. P., LAU, L. F. *CYR61*, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Molecular and Cellular Biology*, v. 16, n. 4, p. 1326-34, 1996.
- KLAUSNER, J. S., BELL, F. W., HAYDEN, D. W., JOHNSTON, S. D., LUND, E. M. Recent developments in the diagnosis and treatment of HPB and prostatic Carcinoma. *Proc. Am. Coll. Vet. Int. Med.*, p. 547- 548, 1994.
- KOBAYASHI, R., REEVE JR, J. R., WALSH, J. H. Isolation and partial characterization of canine epidermal growth factor/urogastrone. *Biochem. J.*, v. 229, p. 611-61, 1985.
- KOCH, C. A., ANDERSON, D., MORAN, M. F., ELLIS, C., PAWSON, T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*, v. 252, n. 5006, p. 668-74, 1991.
- KOIKE, N., TAKEYOSHI, I., OHKI, S., TOKUMINE, M., MATSUMOTO, K., MORISHITA, Y. Effects of adding P38 mitogen-activated protein-kinase inhibitor to celsior solution in canine heart transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation*, v. 77, n. 2, p. 286-92, 2004.
- KOZLOWSKI, J. M. Prostate cancer. In: KNOBIL, E., NEILL, J. D. *Encyclopedia of reproduction*. San Diego: Academic Press, 1999. p. 67-76.
- KRAWIEC, D. R. Canine prostate disease. *J. Amer. Veter. Medical Assoc*, v. 19, n. 5, p. 373-388, 1995.

- KUMAR, V. L., MAJUMDER, P. K. Prostate gland: structure, functions and regulation. *International urology and nephrology*, v. 27, n. 3, p. 231-43, 1995.
- KUMAR, V., BUSTIN, S. A., MCKAY, I. A. Transforming Growth Factor alpha. *Cell Biol Int*, v. 19, n. 5, p. 373-388, 1995.
- KUMMER, J. L., RAO, P. K., HEIDENREICH, K. A. Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 33, p. 20490-4, 1997.
- KUSTRITZ, R. Medical treatment of canine prostatic disease, 2006. Disponível em: www.geocities.com/dachshealth/medical_treatment_of_canine_pros.htm. Acesso em: 10 Jan 2006.
- LAEMMLI, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAUFER-AMORIM, R. *Estudo clínico, laboratorial e anatomopatológico das próstatas de cães adultos*. 2001. 117 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu.
- LAVOIE, J. N., L'ALLEMAIN, G., BRUNET, A., MULLER, R., POUYSSEGUR, J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 34, p. 20608-16, 1996.
- LEASEK, A., ABRAHAN, D. J. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *Journal of Cell Science*, v. 119, n. 23, p. 4803-4810, 2006.
- LEAV, I., LING, G.V. Adenocarcinoma of the canine prostate. *Cancer*, v. 22, n.6, p. 1329-45, 1968
- LEE, C., KOZLOWSKI, J. M., GRAYHACK, J. T. Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth. *Prostate*, v. 31, n. 2, p. 131-138, 1997.
- LEIB, M.S. Squamous cell carcinoma of the prostate gland in a dog. *The Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 22, p. 509-14, 1986.

LENZ, G. Mecanismos de Transdução de Sinal Ativados por Purinas, Pirimidinas e Fatores de Crescimento em Culturas de Astrócitos. 2000. 164 f. Tese (Doutorado) - *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, Porto Alegre.

LI, C., FRANKLIN, J. F., GRAVES-DEAL, R., JEROME, W. G., CAO, Z., COFFEY, R. J. Myristoylated Naked2 escorts transforming growth factor α to the basolateral plasma membrane of polarized epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 15, p. 5571-5576, 2004.

LI, S., GERRARD JR, E. R., BALKOVETZ, D. F. Evidence for ERK1/2 phosphorylation controlling contact inhibition of proliferation in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *American journal of physiology Cell physiology*, v. 287, n. 2, p. C432-9, 2004.

LIN, S. Y., MAKINO, K., XIA, W., MATIN, A., WEN, Y., KWONG, K. Y., BOURGUIGNON, L., HUNG, M. C. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol.*, v. 3, n. 9, p. 802-808, 2001.

LOWENSTEIN, E. J., DALY, R. J., BATZER, A. G., LI, W., MARGOLIS, B., LAMMERS, R., ULLRICH, A., SKOLNIK, E. Y., BAR-SAGI, D., SCHLESSINGER, J. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, 70: 431-42, 1992.

LOWSETH, L. A., GERLACH, R. F., GILLETT, N. A., MUGGENBURG, B. A. Age-related in the prostate and testes of the beagle dog. *Veterinary Pathology*, v. 37, n. 5, p. 347-53, 1990.

LUNA, L. G. *Manual of histological staining methods of the armed forces institute of pathology*, 3 ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258 p.

LYNCH, S. E., NIXON, J. C., COLVIN, R. B., ANTONIADES, H. N. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 84, n. 21, p. 7696-7700, 1987.

- MACLAUGHLAN, S. D., PALOMINO, W. A., BILAN, M., LEWIS, T. D., LININGER, R. A., LESSEY, B. A. Endometrial expression of CYR61: a marker of estrogenic activity in normal and abnormal endometrium. *Obstetrics & Gynecology*, v.110, p.146-154. 2007.
- MALIK, S. N., BRATTAIN, M., GHOSH, P. M., TROYER, D. A., PRIHODA, T., BEDOLLA, R., KREISBERG, J. I. Immunohistochemical demonstration of phospho-Akt in high Gleason grade prostate cancer. *Clinical cancer research*, v. 8, p. 1168-71, 2002.
- MARGOLIS, B. Proteins with SH2 domains: transducers in the tyrosine kinase signaling pathway. *Cell Growth and Differen*, v. 3, n. 1, p. 73-80, 1992.
- MARSHALL, C. J. Signal transduction. Taking the Rap. *Nature*, v. 392, n. 6676, p. 553-4, 1998.
- MARSHALL, C. J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, v. 80, n. 2, p. 179-85, 1995.
- MARTINS, A. C. P., SUAID, H. J., COLOGNA, A. J. Prostatites. Uronews [online], 2000. Disponível em: http://www.sbu-mg.org.br/Guia_pratico.htm. Acesso em: 14 de Junho de 2003.
- MASSAGUÉ, J. The TGF β family of growth and differentiation factors. *Cell*, v. 49, n. 4, p. 437-8, 1987.
- MASSAGUÉ, J., PANDIELLA, A. Membrane-anchored growth factors. *Annual Review of Biochemistry*, v. 62, p. 515-41, 1993.
- McENTEE, M., ISAACS, W., SMITH, C. Adenocarcinoma of the canine prostate: immunohistochemical examination for secretory antigens. *Prostate*, v. 11, n. 2, p. 163-70, 1987.
- MENENDEZ, J. A., MEHMI, I., GRIGGS, D. W., LUPU, R. The angiogenic factor *CYR61* in breast cancer: molecular pathology and therapeutic perspectives. *Endocrine-Related Cancer*, v. 10, n. 2, p. 141-52, 2003.

modulators emerge from the bunker. *Journal of Cell Science*, v. 119, n. 23, p. 4803-4810, 2006.

MOURA, V. M. B. D. Estudo laboratorial, anatomopatológico e imunoistoquímico da próstata de cães adultos. 2004. 160 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, *Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"*, Botucatu.

MULET, A., GARRIDO, G., ALVAREZ, A., MENENDEZ, T., BOHMER, F. D, PEREZ, R., FERNANDEZ, L. E. The enlargement of the hormone immune deprivation concept to the blocking of TGF α -autocrine loop: EGFR signaling inhibition, *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 55, n. 5, p. 628-38, 2006.

MUSTOE, T. A., PIERCE, G. F., THOMASON, A., GRAMETES, P., SPORN, M. B., DEUEL, T. F. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor β . *Science*, v. 237, n. 4820, p. 1333-1336, 1987.

NAUS, C. C., BOND, S. L., BECHBERGER, J. F., RUSHLOW, W. Identification of genes differentially expressed in C6 glioma cells transfected with connexin43. *Brain Research Reviews*, v. 32, n. 1, p. 259-66, 2000.

NERURKAR, V. R., SESHADRI, R., MULHERKAR, R., ISHWAD, C. S., LALITHA, V. S., NAIK, S. N. Receptors for epidermal growth factor and estradiol in canine mammary tumors. *Int J Cancer*, v. 40, n. 2, p.230-232, 1987.

O'BRIEN, T. P., YANG, G. P.; SANDERS, L., LAU, L. F. Expression of *CYR61*, a growth factor- inducible immediate-early gene. *Molecular and Cellular Biology*, v. 10, n. 7, p. 3569-3577, 1990.

O'BRIEN, T. P., LAU, L. F. Expression of the growth factor-inducible immediate early gene *CYR61* correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development. *Cell Growth & Differentiation*, v. 3, n. 9, p. 645-54, 1992.

OLIVA-HERNANDEZ, J., PÉREZ-GUTIÉRREZ, J. F. Localization of the epidermal growth factor (EGF) in the epididymis and accessory genital glands of the boar and functional effects on spermatozoa. *Theriogenology*, v. 70, n. 7., p. 1159–1169, 2008.

OLIVEIRA, K. S. Perfil imunoistoquímico da expressão da proteína *cyr61* e da proteína quinase ativada por mitógeno em próstatas de cães. 2005. 53 f. Dissertação (mestrado) – Escola de Veterinária, *Universidade Federal de Goiás* Goiânia.

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

OLSON, P. N., WRIGLEY, R. H., THRALL, M. A., HUSTED, P. W. Disorders of the canine prostate gland: pathogenesis, diagnosis and medical therapy. *Comp. Cont. Ed.* v. 9, p. 613- 623, 1987.

PAPATSORIS, A. G., PAPAVALASSILIOUS, A. G. Molecular "palpation" of BPH: a tale of MAPK signalling?, *Trends molecular medicine*, v. 7, n. 7, p. 288-92, 2001.

PÁRAMA-RAMÍREZ, R. M. Utilización e agonistas de GnRH para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna. 2005 In: *www.portalveterinaria.com*. Acesso: dez 2005.

PEDERSEN, M. W., POULSEN, H. S. Mutationer i epidermal vækstfaktor- receptoren: struktur og tumorbilologisk relevans. *UGESKR LÆGER*, v.168, n. 24, p. 2354-2361, 2006.

PENDURTHI, U. R., ALLEN, K. E., EZBAN, M., RAO, L. V. Factor VIIa and thrombin induce the expression of *CYR61* and connective tissue growth factor, extracellular matrix signaling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor-induced signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 19, p. 14632-41, 2000.

PERALTA-ZARAGOZA, O., BAHENA-ROMÁN, M., DÍAZ-BENÍTEZ, C. E., MADRID-MARINA, V. M. C. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapêuticas. *Salud Publica México*, v. 39, n.5, p. 451-462, 1997.

PORTO, C. S., LUCAS, T. F. G., SIU, E. R., ROYER, C., TRINDADE, E. S., NADER, H. B., LAZARI, M. F. M. Muscarinic acetylcholine receptors: relevance to infertility and male contraception. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*, v. 8, n. 1, p. 42-50, 2008.

POULET, F. Evolution de la prostate canine en fonction de l'âge. *Ann. Med. Vet*, v. 129, p. 567-84, 1985.

PURSWELL, B. J., PARKER, N. A., FORRESTER, S. D. Prostatic diseases in dogs: a review. *Veterinary Medicine*, v. 95, p. 315-21, 2000.

QIU, Q., YANG, M., TSANG, B. K., GRUSLIN, A. Both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling are required in epidermal growth factor-induced human trophoblast migration. *Molecular Human Reproduction*, v.10, n.9, p. 677-684, 2004.

QUILIAN, L. A., KHOSRAVI-FAR, R., ROSSMAN, K. L., HUFF, S. Y., DER, C. J. Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *BioEssays*, v. 17, n. 5, p. 395-404, 1995.

RACKE, F. K., LEWANDOWSKA, K., GOUELI, S., GOLDFARB, A. N. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 37, p. 23366-70, 1997.

RALL, L. B., SCOTT, J., BELL, G. I., CRAWFORD, R. J., PENSCHOW, J. D., NIALL, H. D., COGHLAN, J. P. Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature*, v. 313, p. 228 - 231, 1985.

REITER, J. L. e MAIHLE, N. T. Characterization and expression of novel 60 kDa and 110 kDa EGFr isoforms in human placenta. *Annals New York Academy science*, v. 995, p. 39-47, 2003.

RIVERA-GONZALEZ, R., PETERSEN, D. N., TKALCEVIC, G., THOMPSON, D. D., BROWN, T. A. Estrogen-induced genes in the uterus of ovariectomized rats and their

regulation by droloxifene and tamoxifen. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, v. 64, n. 1-2, p. 13-24, 1998.

ROBERTS, A. B., ANZANO, M. A., WAKEFIELD, L. M., ROCHE, N. S., STERN, D. F., SPORN, M. B. Type β transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, v. 82, n. 1, p. 119-123, 1985.

ROGERS, K. S., WANTSCHEK, L., LEES, G.E. Diagnostic evaluation of the canine prostate. *Comp. Cont. Educ.*, v. 8, n. 11, p. 799-811, 1986.

ROYUELA, M., ARENAS, M. I., BETHENCOURT, F. R., SANCHEZ-CHAPADO, M., FRAILE, B., PANIAGUA, R. Regulation of proliferation/apoptosis equilibrium by mitogen-activated protein kinases in normal, hyperplastic, and carcinomatous human prostate. *Human pathology*, v. 33, n. 3, p. 299-306, 2002.

ROZAKIS-ADCOCK, M., FERNLEY, R., WADE, J., PAWSON, T., BOWTELL, D. The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature*, v. 363, p. 83-85, 1993.

RUSSELL, D. W., WILSON, J. D. Steroid 5 α -reductase: two genes/two enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* v. 63, p. 25-61, 1994.

SAKAMOTO, S., YOKOYAMA, M., PRAKASH, K., TSURUHA, J., MASAMOTO, S., GETZENBERG, R. H., KAKEHI, Y. Development of quantitative detection assays for *CYR61* as a new marker for benign prostatic hyperplasia. *Journal Biomolecular Screening*, v. 8, n. 6, p. 701-11, 2003.

SAMPATH, D., WINNEKER, R. C., ZHANG, Z. *CYR61*, a member of the CCN family, is required for MCF-7 cell proliferation: regulation by 17 β -estradiol and overexpression in human breast cancer. *Endocrinology*, v. 142, n. 6, p. 2540-8, 2001.

SCHLESSINGER, J. The epidermal growth factor receptor as a multifunctional allosteric protein. *Biochemistry*, v. 27, n. 9, p. 3119-3123, 1988.

SCHOBER, J. M., CHEN, N., GRZESZKIEWICZ, T. M., JOVANOVIC, I., EMESON, E. E., UGAROVA, T. P., YE, R. D., LAU, L. F., LAM, S. C. Identification of integrin

alpha(M)beta(2) as an adhesion receptor on peripheral blood monocytes for *CYR61* (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2): immediate-early gene products expressed in atherosclerotic lesions. *Blood*, v. 99, n. 12, p. 4457-65, 2002.

SCHREIBER, A. B., WINKLER, M. F., DERYNCK, R. Transforming growth factor α a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science*, v. 232, n. 4755, p. 1250-1253, 1988.

SCHULTZ, G. S., WHITE, M., MITCHELL, R., BROWN, G., LYNCH, J., TWARDZIK, D. R., TODARO, G. J. Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor α and vaccinia growth factor. *Science*, v. 235, n. 4786, p. 350-352, 1987.

SCHUTZE, N., LECHNER, A., GROLL, C., SIGGELKOW, H., HUFNER, M., KOHRLE, J., JAKOB, F. The human analog of murine cysteine rich protein 61 [correction of 16] is a 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ responsive immediate early gene in human fetal osteoblasts: regulation by cytokines, growth factors, and serum. *Endocrinology*, v. 139, n. 4, p. 1761-70, 1998.

SEWING, A., WISEMAN, B., LLOYD, A. C., LAND, H. High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Molecular and Cellular Biology*, v. 17, n. 9, p. 5588-5597, 1997.

SHRESTHA, P., YAMADA, K., HIGASHIYAMA, H., TAKAGI, H., MORI, M. Epidermal growth factor receptor in odontogenic cysts and tumors. *J Oral Pathol Med*, v. 21, n. 7, p. 314 – 317, 1992.

SHULZE, H., BERRACK, E. R. Immunocytochemical localization of estrogen receptors in spontaneous and experimentally induced canine benign prostatic hyperplasia. *Prostate*, v.11, n.2, p.145-162, 1987.

SIMMONS, D. L., LEVY, D. B., YANNONI, Y., ERIKSON, R. L. Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 86, n. 4, p. 1178-82, 1989.

SOARES, R., PEREIRA, M. B., SILVA, C., AMENDOEIRA, I., WAGNER, R., FERRO, J., SCHMITT, F. C. Expression of TGF- α and EGFR in Breast Cancer and its Relation to Angiogenesis. *Breast J*, v. 6, n. 3, p. 171-177, 2000.

SPORN, M. B., ROBERTS, A. B., SHULL, J. H., SMITH, J. M., WARD, J. M. Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. *Science*, v. 219, n. 4590, p. 1329-1331, 1983.

STEPAN, V., PAUSAWASDI, N., RAMAMOORTHY, S., TODISCO, A. The Akt and MAPK signal-transduction pathways regulate growth factor actions in isolated gastric parietal cells. *Gastroenterology*, v. 127, n. 4, p. 1150-61, 2004.

TAMADA, H., TOMINAGA, M., KIDA, K., KAWATE, N., INABA, T., MATSUYAMA, S., SAWADA, T. Detection of transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor mRNA and immunohistochemical localization of the corresponding proteins in the canine uterus during the estrous cycle. *Histol. Histopathol*, v. 20, n. 3, p. 817-824, 2005.

TAMURA, I., ROSENBLOOM, J., MACARAK, E., CHAQOUR, B. Regulation of Cyr61 gene expression by mechanical stretch through multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 281, n. 5, p.1524-1532, 2001.

TAYLOR, T. B., RAMSDELL, J. S. Transforming growth factor- α and its receptor are expressed in the epithelium of the rat prostate gland. *Endocrinol*, v. 133, n. 9, p. 1306–1311, 1993.

TOYODA, H., KOMURASAKI, T., UCHIDA, D., TAKAYAMA, Y., ISOBE, T., OKUYAMA, T., HANADA, K. Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 13, p. 7495-500, 1995.

ULLRICH, A., SCHLESSINGER, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, v. 61, n. 2, p. 203-12, 1990.

- UZGARE, A. R., KAPLAN, P. J., GREENBERG, N. M. Differential expression and/or activation of P38MAPK, ERK 1/2, and JNK during the initiation and progression of prostate cancer. *Prostate*, v. 55, n. 2, p.128-39, 2003.
- VAN DER GEER, P., PAWSON, T. The PTB domain, a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochemical Science*, v. 20, n. 7, p. 277-280, 1995.
- VERED, M., SHOHAT, I., BUCHNER, A. Epidermal growth factor receptor expression in ameloblastoma. *Oral Oncol*, v. 39, n. 2, p. 138-143, 2003.
- WAGNER, C. L., RYAN, R. M., FORSYTHE, D. E., KEENAN, A., FINKELSTEIN, J. N. Secretion of transforming growth factor- α (TGF α) by postnatal rabbit alveolar macrophages. *Pediatric research*, v. 38, n. 1, p. 49-54, 1995.
- WALZ, W., GIMPL, G., OHLEMEYER, C., KETTENMANN, H. Extracellular ATP-induced currents in astrocytes: involvement of a cation channel. *Journal Neuroscience Research*, v. 38, n. 1, p. 12-8, 1994.
- WATERS, D. J., BOSTWICK, D. G. Prostatic intraepithelial neoplasia occurs spontaneously in the canine prostate. *Journal Urology*, v. 157, n. 2, p. 713-726, 1997.
- WEISS, A., SCHLESSINGER, J. Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell*, v. 94, n. 3, p. 277-280, 1998.
- WELLS, A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 31, n. 6, p. 637-643, 1999.
- WHITMARSH, A. J., CAVANAGH, J., TOURNIER, C., YASUDA, J., DAVIS, R. J. A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science*, v. 281, n. 5383, p. 1671-1674, 1998.
- WIDMANN, C., GIBSON, S., JARPE, M. B., JOHNSON, G. L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiologic Rev*, v. 79, n. 1, p. 143-80, 1999.
- XIA, Z.; DICKENS, M.; RAINGEAUD, J.; DAVIS, R. J.; GREENBERG, M. E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, v. 270, n. 5240, p. 1326-31, 1995.

XIE, D., MILLER, C. W., O'KELLY, J., NAKACHI, K., SAKASHITA, A., SAID, J. W., GORNBEIN, J., KOEFFLER, H. P. Breast cancer. *CYR61* is overexpressed, estrogen-inducible, and associated with more advanced disease. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 17, p. 14187-94, 2001.

XING, J., GINTY, D. D., GREENBERG, M. E. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science*, v. 273, n. 5277, p. 959-63, 1996.

YAMADA, K., IWAI, K., OKADA, Y., MORI, M. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor in salivary gland tumours. *Virchows Arch*, v. 415, n. 6, p. 523-531, 1989.

YANG, G. P., LAU, L. F. *CYR61*, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface. *Cell Growth & Differentiation*, v. 2, n. 7, p. 351-7, 1991.

ZIADA, A., ROSENBLUM, M., CRAWFORD, E. D. Benign prostatic hyperplasia: an overview. *Urology*, v. 53, n. 3, suppl. 3a, p. 1-6, 1999.

ANEXOS

Solução RIPA

50mM Tris-HCl, pH=7,4
150mM NaCl
1mM EDTA
1% Triton x-100
1% Sodium deoxycholate
0,1% SDS
Adicionar inibidores de proteases e 100mM de ortovanadato

Gel de poliacríamida SDS PAGE 10%

Gel de separação

Água destilada.....5,9 mL
Mistura de acrilamida/bis-acrilamida.....5 mL
Tris HCl 1,5M, pH 8,8.....3,8 mL
SDS 10%.....150 µL
APS 10%.....150 µL
TEMED (6,6M).....6 µL

Gel de empacotamento

Água destilada.....2,25 mL
Mistura de acrilamida/bis-acrilamida.....0,65 mL
Tris HCl 1,5M, pH 8,8.....1 mL
SDS 10%.....40 µL
APS 10%.....40 µL
TEMED (6,6M).....4 µL

Solução de TBS-T (pH 7,4, 1L, 10%)

Tris.....12,1g

NaCl.....87,60g
H₂O destilada.....1000mL
Tween 20.....500µL

Análise IHQ dos cortes histológicos para cada diagnóstico e para cada proteína

CYR61							
Diagnóstico NORMAL							
Componentes estromais	2AF	7AA	12CA	5AA	7BA	TOTAL	
FML	2	1	1	1	2	1,4	
F	1	----	1	1	1	0,8	
MLA	3	1	1	2	2	1,8	
CE	1	1	----	1	1	0,8	
CM	----	----	----	----	----	0	
Componente epitelial							
citoplasma	1	1	1	1	1	1	
núcleo	2	2	1	2	2	1,8	
CYR61							
Diagnóstico HPB-ep							
Componentes estromais	1AA	1CA	8BA	4AA	9AA	12BA	TOTAL
FML	2	2	3	2	3	1	2,16
F	1	1	2	1	2	1	1,33
MLA	3	3	3	2	3	1	2,5
CE	2	1	1	1	2	1	1,33
CM	1	2	2	1	2	1	1,5
Componente epitelial							
citoplasma	1	1	2	1	2	1	1,33
núcleo	3	3	1	2	1	1	1,83

CYR61							
Diagnóstico HPB-e							
Componentes estromais	3AA	13BA	21CA	26AA	26BA	26CA	TOTAL
FML	1	3	1	2	2	2	1,83
F	1	3	1	2	1	1	1,5
MLA	3	3	1	2	2	2	2,16
CE	1	1	1	1	1	1	1
CM	1	2	1	2	1	1	1,33
Componente epitelial							
citoplasma	1	2	1	2	1	1	1,33
núcleo	----	1	----	----	----	1	0,33

CYR61							
Diagnóstico CHPB							
Componentes estromais	10AA	10BA	16BA	16CA	17BA	18AA	TOTAL
FML	3	3	3	2	3	1	2
F	3	1	3	2	1	1	1,83
MLA	3	2	3	1	2	1	2
CE	3	2	3	2	2	2	2,33
CM	3	----	3	2	1	1	1,66
Componente epitelial							
citoplasma	3	3	----	1	1	1	1,5
núcleo	3	----	----	3	2	2	1,66

CYR61			
Diagnóstico PROSTATITE			
Componentes estromais	2BF	2CF	TOTAL
FML	1	1	1
F	----	1	0,5
MLA	----	1	0,5

CE	----	----	0
CM	1	1	1
Componente epitelial			
citoplasma	1	1	1
núcleo	1	1	1

CYR61				
Diagnóstico DISPLASIA				
Componentes estromais	6BA	21AA	21BA	TOTAL
FML	1	----	1	0,66
FML	1	1	----	0,66
MLA	----	----	----	0
CE	1	1	1	1
CM	1	1	1	1
Componente epitelial				
citoplasma	1	1	1	1
núcleo	2	1	----	1

EGF						
Diagnóstico NORMAL						
Componentes estromais	2AF	7AA	12CA	5AA	7BA	TOTAL
FML	1	1	1	1	1	1
FML	1	1	1	1	1	1
MLA	2	----	----	1	1	0,8
CE	----	1	1	1	1	0,8
CM	----	----	----	----	----	----
Componente epitelial						
citoplasma	1	----	----	----	1	0,4
núcleo	2	1	2	1	2	1,6

EGF							
Diagnóstico HPB-ep							
Componentes estromais	1AA	1CA	8BA	4AA	9AA	12BA	TOTAL
FML	1	1	1	1	1	2	1,16
FML	1	1	1	1	----	----	0,66
MLA	----	1	----	1	----	----	0,33
CE	1	1	1	----	1	1	0,83
CM	----	1	----	----	----	----	0,16
Componente epitelial							
citoplasma	----	1	1	1	----	1	0,66
núcleo	1	2	2	----	2	----	1,16

EGF							
Diagnóstico HPB-e							
Componentes estromais	3AA	13BA	21CA	26AA	26BA	26CA	TOTAL
FML	1	----	1	1	1	1	0,83
FML	1	----	----	----	----	1	0,33
MLA	----	----	----	1	1	----	0,33
CE	----	1	1	1	----	----	0,5
CM	----	1	1	----	----	1	0,5
Componente epitelial							
citoplasma	1	----	----	----	----	1	0,33
núcleo	2	2	----	----	----	----	0,66

EGF							
Diagnóstico CHPB							
Componentes estromais	10AA	10BA	16BA	16CA	17BA	18AA	TOTAL
FML	1	1	1	1	1	----	0,83
FML	----	1	----	1	----	----	0,33
MLA	1	----	1	1	1	----	0,66

CE	1	2	1	1	1	----	1
CM	1	1	----	----	----	1	0,5
Componente epitelial							
citoplasma	1	1	----	1	1	----	0,66
núcleo	1	2	----	2	----	2	1,16

EGF				
Diagnóstico PROSTATITE				
Componentes estromais		2BF	2CF	TOTAL
FML		1	1	1
FML		1	1	1
MLA		----	----	----
CE		----	----	----
CM		----	----	----
Componente epitelial				
citoplasma		1	1	1
núcleo		2	1	1,33

EGF				
Diagnóstico DISPLASIA				
Componentes estromais	6BA	21AA	21BA	TOTAL
FML	1	1	1	1
FML	1	----	1	0,66
MLA	----	----	1	0,33
CE	1	1	1	1
CM	----	1	1	0,66
Componente epitelial				
citoplasma	----	1	1	0,66
núcleo	----	----	----	

TGF- α						
Diagnóstico NORMAL						
Componentes estromais	2AF	7AA	12CA	5AA	7BA	TOTAL
FML	----	1	----	----	----	0,2

F	----	----	----	----	1	0,2
MLA	1	----	----	----	----	0,2
CE	1	----	----	----	----	0,2
CM	----	----	----	----	----	----
Componente epitelial						
citoplasma	1	1	1	1	1	1
núcleo	----	----	----	----	----	----

TGF-α							
Diagnóstico HPB-ep							
Componentes estromais	1AA	1CA	8BA	4AA	9AA	12BA	TOTAL
FML	----	1	----	1	----	1	0,5
F	----	1	----	1	----	----	0,33
MLA	----	----	----	----	----	----	----
CE	----	----	1	----	----	----	0,16
CM	1	1	1	----	----	----	0,5
Componente epitelial							
citoplasma	1	1	1	1	----	1	0,83
núcleo	----	----	----	----	----	----	----

TGF-α							
Diagnóstico HPB-e							
Componentes estromais	3AA	13BA	21CA	26AA	26BA	26CA	TOTAL
FML	1	----	1	----	1	1	0,66
F	1	----	1	----	1	1	0,66
MLA	----	----	----	----	----	----	----
CE	----	----	----	----	----	1	0,16
CM	1	----	----	1	1	1	0,66
Componente epitelial							
citoplasma	1	1	1	1	1	1	1
núcleo	----	----	1	----	----	----	0,16

TGF-α							
Diagnóstico CHPB							
Componentes estromais	10AA	10BA	16BA	16CA	17BA	18AA	TOTAL
FML	----	1	1	----	1	----	0,5
F	----	----	----	----	----	1	0,16
MLA	----	----	----	----	----	----	----
CE	1	1	----	----	1	1	0,66

CM	1	1	1	----	----	----	0,5
Componente epitelial							
citoplasma	1	1	1	1	1	1	1
núcleo	----	----	----	----	----	----	----

TGF- α				
Diagnóstico PROSTATITE				
Componentes estromais		2BF	2CF	TOTAL
FML		1	1	1
F		1	1	1
MLA		----	----	----
CE		----	----	----
CM		----	----	----
Componente epitelial				
citoplasma		1	1	1
núcleo		----	----	----

TGF-α				
Diagnóstico DISPLASIA				
Componentes estromais	6BA	21AA	21BA	TOTAL
FML	1	1	----	0,66
F	1	1	----	0,66
MLA	----	----	----	----
CE	----	1	----	0,16
CM	1	1	----	0,66
Componente epitelial				
citoplasma	1	1	1	1
núcleo	----	----	----	----

EGFr						
Diagnóstico NORMAL						
Componentes estromais	2AF	7AA	12CA	5AA	7BA	TOTAL
FML	----	----	----	----	----	----
F	1	----	----	----	----	0,2
MLA	----	----	----	----	----	----
CE	----	----	----	----	----	----
CM	----	----	----	----	----	----
Componente epitelial						
citoplasma	----	----	----	----	----	----

núcleo	2	1	----	1	----	0,8
--------	---	---	------	---	------	-----

EGFr							
Diagnóstico HPB-ep							
Componentes estromais	1AA	1CA	8BA	4AA	9AA	12BA	TOTAL
FML	----	1	1	----	----	1	0,5
F	1		1	----	----	----	0,33
MLA	1	----	----	----	----	----	0,16
CE	----	----	----	----	----	----	----
CM	----	----	----	----	----	----	----
Componente epitelial							
citoplasma	----	----	----	----	----	----	----
núcleo	1	1	1	1	1	2	1,16

EGFr							
Diagnóstico HPB-e							
Componentes estromais	3AA	13BA	21CA	26AA	26BA	26CA	TOTAL
FML	----	----	1	----	1	1	0,5
F	1	----	1	1	----	1	0,66
MLA	----	----	----	----	----	----	----
CE	----	----	----	----	----	----	----
CM	----	----	----	1	----	1	0,33
Componente epitelial							
citoplasma	----	----	----	----	----	2	0,33
núcleo	1	1	1	1	1	1	1

EGFr							
Diagnóstico CHPB							
Componentes estromais	10AA	10BA	16BA	16CA	17BA	18AA	TOTAL
FML	1	----	1	----	1	----	0,5
F	----	1	1	----	----	----	0,33
MLA	----	----	----	----	----	----	----
CE	----	----	----	----	----	----	----
CM	----	1	----	----	----	----	0,16
Componente epitelial							
citoplasma	----	----	----	----	----	----	----
núcleo	1	1	1	1	1	1	1

EGFr			
Diagnóstico PROSTATITE			
Componentes estromais	2BF	2CF	TOTAL
FML	----	1	0,5
F	1	1	1
MLA	----	----	----
CE	----	----	----
CM	1	----	0,5
Componente epitelial			
citoplasma	----	----	----
núcleo	1	1	1

EGFr				
Diagnóstico DISPLASIA				
Componentes estromais	6BA	21AA	21BA	TOTAL
FML	----	1	1	0,66
F	1	----	1	0,66
MLA	----	----	----	----
CE	----	----	1	0,33
CM	1	----	----	0,33
Componente epitelial				
citoplasma	----	----	----	----
núcleo	1	----	1	0,66

p-ERK1/2						
Diagnóstico NORMAL						
Componentes estromais	2AF	7AA	12CA	5AA	7BA	TOTAL
FML	1	1	1	1	1	1
F	1	----	1	1	1	0,8
MLA	----	1	1	1	----	0,6
CE	1	----	----	1	----	0,4
CM	----	----	----	1	----	0,2
Componente epitelial						
citoplasma	----	----	----	----	----	----
núcleo	1	1	1	1	1	1

p-ERK1/2							
Diagnóstico HPB-ep							
Componentes estromais	1AA	1CA	8BA	4AA	9AA	12BA	TOTAL

FML	1	1	1	1	1	1	1
F	----	1	1	----	1	----	0,5
MLA	----	1	----	----	1	1	0,5
CE	----	1	----	----	----	----	0,16
CM	1	1	----	----	----	----	0,33
Componente epitelial							
citoplasma	1	1	----	1	----	1	0,66
núcleo	1	1	1	1	----	1	0,83

p-ERK1/2							
Diagnóstico HPB-e							
Componentes estromais	3AA	13BA	21CA	26AA	26BA	26CA	TOTAL
FML	1	1	1	1	1	1	1
F	1	1	1	----	1	1	0,83
MLA	----	1	1	1	----	1	0,66
CE	----	1	1	1	----	1	0,66
CM	----	----	1	1	----	1	0,5
Componente epitelial							
citoplasma	----	----	----	----	----	----	----
núcleo	1	1	1	1	1	1	1

p-ERK1/2							
Diagnóstico CHPB							
Componentes estromais	10AA	10BA	16BA	16CA	17BA	18AA	TOTAL
FML	1	1	1	----	1	1	0,83
F	1	----	1	----	1	1	0,66
MLA	----	----	----	----	1	----	0,16
CE	1	1	1	----	1	1	0,83
CM	----	----	----	----	1	----	0,16
Componente epitelial							
citoplasma	----	----	----	----	----	----	----
núcleo	1	1		1	1	1	0,83

p-ERK1/2			
Diagnóstico PROSTATITE			
Componentes estromais	2BF	2CF	TOTAL
FML	1	1	1
F	1	1	1
MLA	----	----	----

CE	----	----	----
CM	----	----	----
Componente epitelial			
citoplasma	----	----	----
núcleo	1	1	1