

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

**EFEITOS DA TOXINA BOTULÍNICA DO TIPO A ISOLADA OU
EM ASSOCIAÇÃO COM A FINASTERIDA SOBRE A
PRÓSTATA DO CÃO E RATO SPRAGUE-DAWLEY.**

Giuliano Queiroz Mostachio
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2012

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

**EFEITOS DA TOXINA BOTULÍNICA DO TIPO A ISOLADA OU
EM ASSOCIAÇÃO COM A FINASTERIDA SOBRE A
PRÓSTATA DO CÃO E RATO SPRAGUE-DAWLEY.**

Giuliano Queiroz Mostachio

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

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 Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2012

M915e Mostachio, Giuliano Queiroz
Efeitos da toxina botulínica do tipo A isolada ou em associação com a finasterida sobre a próstata do cão e rato sprague-dawley. / Giuliano Queiroz Mostachio. -- Jaboticabal, 2012
xix, 102 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente
Banca examinadora: Aracéle Elisane Alves, Fabiana Ferreira de Souza, Maria Denise Lopes, Maricy Apparício Ferreira
Bibliografia

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

CDU 619:612.6:636.7:599.325

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GIULIANO QUEIROZ MOSTACHIO – nascido na cidade de Ilha Solteira, São Paulo, aos 21 dias do mês de Setembro do ano de 1978, filho de Valdomiro Mostachio e Anail Alves de Queiroz Mostachio. Em Fevereiro de 2003, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Londrina. Durante a graduação realizou inúmeros estágios nas áreas de Clínica Cirúrgica e Teriogenologia de Animais de Companhia. Nos anos de 2004 e 2005 participou do programa de aprimoramento (residência) em Reprodução e Obstetrícia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Em Março de 2006 ingressou no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em nível de Mestrado, obtendo bolsa junto à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP. Em Março de 2008 iniciou o curso de Doutorado pelo mesmo programa e instituição, onde prestou atendimento no Serviço de Reprodução e Obstetrícia Veterinária do hospital veterinário “Governador Laudo Natel” até Fevereiro de 2012 quando obteve o título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

"Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe. "

Leonardo da Vinci

"A educação é aquilo que sobrevive depois que tudo o que aprendemos foi esquecido. "

Burrhus Frederic Skinner

"A amizade é um amor que nunca morre. "

Mário Quintana

Dedico

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

Vocês são especiais.

*Aos meus irmãos, Giuseppe e Anna Karina, pelo incentivo e todos os
momentos de alegria e por se tornarem pessoas que me enchem de orgulho e
admiração.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, pela orientação, amizade, confiança e por ter compartilhado comigo seu conhecimento e experiência, inspirando-me à construção de uma vida profissional ética. Tenha sempre meu respeito e gratidão.

As minhas amigas e “família” da Obstetrícia Maricy Apparício, Aracélle Elisane Alves, Tathiana Ferguson Motheo, Luciana Cristina Padilha, Paula Andressa Pennacchi Savi, com as quais compartilhei de forma harmônica todos esses anos. Vocês são verdadeiras irmãs e a nossa amizade sempre ficará guardada no coração.

Aos amigos de pós-graduação, Diogo José Cardilli, Eliandra Antônia Pires-Buttler, Caio Tiosso, Ricardo Andres Uscategui, Raquel Ribeiro Gutierrez, Beatrice Macente e Felipe Barros pelos momentos de descontração, discussões e de ensinamentos.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária desta faculdade, em especial a Arnildo e Izilda pelo auxílio e amizade.

Às professoras Maria Denise Lopes e Fabiana Ferreira de Souza, pelas grandes contribuições na elaboração desta tese.

Aos professoras Paulo Henrique Franscechini, Juliana Corrêa Borges Silva e Eliandra Antônia Pires-Buttler por terem participado do meu exame de qualificação contribuindo para a finalização deste trabalho.

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

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

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa (processo n° 08/53916-4) e auxílio à pesquisa (processo n° 08/53917-0).

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
 CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	
1. Descrição Anatômica, Funcional e Histológica da Próstata.....	01
2. Hiperplasia Prostática Benigna (HPB).....	04
3. Toxina Botulínica do Tipo A.....	15
 CAPÍTULO 2 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE FINASTERIDA E TOXINA BOTULÍNICA DO TIPO A ASSOCIADA OU NÃO A FINASTERIDA NO TRATAMENTO DA HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA DO CÃO	
Resumo.....	28
Summary.....	29
1. Introdução.....	30
2. Objetivos.....	32
3. Material e Métodos.....	33
3.1. Animais e Grupos Experimentais.....	33
3.2. Procedimento Anestésico.....	34
3.3. Toxina Botulínica do Tipo A.....	34
3.3.1. Técnica de Aplicação.....	35
3.4. Mensuração do Diâmetro e Volume Prostático.....	35
3.4.1. Radiografia Simples e Uretrocistografia Retrógrada.....	35
3.4.2. Ultrassonografia Prostática.....	37
3.5. Avaliação Anatomopatológica.....	37

3.5.1. Avaliação Histológica.....	37
3.5.2. Avaliação <i>in situ</i> da apoptose via TUNEL.....	38
3.6. Análise Estatística.....	39
4. Resultados.....	41
4.1. Análise dos Animais Tratados com Solução Fisiológica 0,9%.....	41
4.1.1. Mensuração do Diâmetro e Volume Prostático.....	41
4.1.1.1. Avaliação Radiográfica.....	41
4.1.1.2. Avaliação Ultrassonográfica.....	42
4.1.2. Avaliação Histológica.....	44
4.1.3. Avaliação <i>in situ</i> da apoptose via TUNEL.....	44
4.1.4. Variações Hematimétricas, Bioquímicas e Urinálise.....	45
4.2. Análise do Animais Tratados com 5 mg de Finasterida.....	45
4.2.1. Mensuração do Diâmetro e Volume Prostático.....	45
4.2.1.1. Avaliação Radiográfica e Ultrassonográfica.....	45
4.2.2. Avaliação Histológica.....	47
4.2.3. Avaliação <i>in situ</i> da apoptose via TUNEL.....	47
4.2.4. Variações Hematimétricas, Bioquímicas e Urinálise.....	48
4.3. Analise dos Animais Tratados com Toxina Botulinica do Tipo A Isoladamente ou Associada a Finasterida.....	48
4.3.1. Mensuração do Diâmetro e Volume Prostático.....	49
4.3.1.1. Avaliação Radiográfica.....	49
4.3.1.2. Avaliação Ultrassonográfica.....	50
4.3.2. Avaliação Histológica.....	56
4.3.3. Avaliação <i>in situ</i> da apoptose via TUNEL.....	56
4.3.4. Variações Hematimétricas, Bioquímicas e Urinálise.....	57
5. Discussão.....	58
6. Conclusões.....	63

CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPROSTÁTICA DE TOXINA BOTULÍNICA DO TIPO A SOBRE O TAMANHO DA PRÓSTATA E FERTILIDADE EM RATOS SPRAGUE-DAWLEY

Resumo.....	64
Summary.....	65
1. Introdução.....	66
2. Objetivos.....	68
3. Material e Métodos.....	69
3.1. Animais e Grupos Experimentais.....	69
3.2. Procedimento Anestésico.....	69
3.3. Toxina Botulínica do Tipo A.....	69
3.3.1. Técnica de Aplicação.....	70
3.4. Mensuração do Peso Prostático (Volume).....	71
3.5. Avaliação Anatomopatológica.....	71
3.5.1. Avaliação Histológica.....	71
3.5.2. Avaliação <i>in situ</i> da apoptose via TUNEL.....	72
3.6. Mensuração da Fertilidade.....	73
3.7. Análise Estatística.....	73
4. Resultados.....	75
4.1. Mensuração do Peso Prostático (Volume).....	75
4.2. Avaliação Histológica.....	76
4.3. Avaliação <i>in situ</i> da apoptose via TUNEL.....	76
4.4. Mensuração da Fertilidade.....	77
5. Discussão.....	79
6. Conclusões.....	83
REFERÊNCIAS.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

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

U	Unidade Biológica
VAMP	Proteína de Membrana Associada à Vesícula
WIN-49596	Zanoterone

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE FINASTERIDA E TOXINA BOTULÍNICA DO TIPO A ASSOCIADA OU NÃO A FINASTERIDA NO TRATAMENTO DA HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA DO CÃO	
Tabela 1. Valores médios $\pm$ desvio padrão dos parâmetros prostáticos de seis cães que receberam a administração intraprostática de solução fisiológica 0,9% (Grupo I), no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2012.....	43
Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio padrão dos parâmetros prostáticos de seis cães que receberam a administração de 5 mg de finasterida (Grupo II), no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2012.....	46
Tabela 3. Valores médios $\pm$ desvios padrão dos parâmetros prostáticos de seis cães que receberam a administração intraprostática de 500 U de toxina botulínica do tipo A (Grupo III), no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2012.....	51
Tabela 4. Valores médios $\pm$ desvios padrão dos parâmetros prostáticos de seis cães que receberam a administração intraprostática de 500 U de toxina botulínica do tipo A associada a 5 mg de finasterida (Grupo IV), no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2012.....	55

CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPROSTÁTICA DE TOXINA BOTULÍNICA DO TIPO A SOBRE O TAMANHO DA PRÓSTATA E FERTILIDADE EM RATOS SPRAGUE-DAWLEY

- Tabela 1. Valores médios $\pm$ desvios padrão dos pesos prostáticos dos animais que receberam a administração intraprostática de solução fisiológica 0,9% (Grupo I) e de toxina botulínica do tipo A (Grupo II), no período de uma e duas semanas. Jaboticabal – SP, 2012.....76
- Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvios padrão de células apoptóticas dos animais que receberam a administração intraprostática de solução fisiológica 0,9% (Grupo I) e de toxina botulínica do tipo A (Grupo II), após uma e duas semanas. Jaboticabal – SP, 2012.....77

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	
Figura 1. Representação esquemática da anatomia do aparelho reprodutor masculino e localização da glândula prostática em cães.....	02
Figura 2. Representação esquemática das principais alterações prostáticas que propiciam o surgimento dos sinais clínicos em cães.....	09
Figura 3. Imagem radiográfica de cão em projeção laterolateral direita da região caudal do abdômen com aumento prostático. Visibilização de deslocamento cranial da bexiga (BX) e dorsal do cólon. Notar discreta posição abdominal da próstata (traços brancos), sendo que esta apresenta aumento superior a 70% da distância sacropubiana (medida entre traços pretos).....	11
Figura 4. Representação esquemática da estrutura molecular da toxina botulínica.....	16
Figura 5. Representação esquemática da clivagem da toxina botulínica e suas respectivas subunidades e funções.....	17
Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de ação da toxina botulínica do tipo A.....	20

- Figura 7. Representação esquemática da denervação química produzida pela toxina botulínica do tipo A. A) Acúmulo de vesícula sináptica. B) Desenvolvimento de brotamentos axonais laterais, provenientes da terminação nervosa original em direção aos nódulos de Ranvier. C) Junção neuro-muscular parcialmente restaurada. D) Involução dos brotamentos e recuperação do terminal nervoso aos 63 dias. E) Restabelecimento da transmissão nervosa normal aos 91 dias.....21

CAPÍTULO 2 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE TOXINA BOTULÍNICA DO TIPO A ASSOCIADA OU NÃO A FINASTERIDA NO TRATAMENTO DA HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA DO CÃO

- Figura 1. Representação gráfica das médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos (comprimento craniocaudal, altura dorsoventral e largura transversal) de seis cães que receberam a administração intraprostática de solução fisiológica 0,9% (Grupo I).....44
- Figura 2. (A) Fotomicrografia de tecido prostático corado por hematoxilina-eosina evidenciando hiperplasia complexa (GI). Observar proliferação estromal (seta grossa) e epitelial cística (seta fina). (B) Tecido prostático tratado com solução fisiológica 0,9% submetido a marcação de núcleos apoptóticos (TUNEL). Observar pequena morte celular (pontos verdes).....45
- Figura 3. Representação gráfica das médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos (comprimento craniocaudal, altura dorsoventral e largura transversal) de seis cães que receberam a administração de 5 mg de finasterida (Grupo II).....47

- Figura 4. Imagem ultrassonográfica evidenciando área hiperecogênica (seta) no parênquima prostático canino devido a dispersão da solução de toxina botulínica do tipo A..... 48
- Figura 5. Representação gráfica das médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos (comprimento craniocaudal, altura dorsoventral e largura transversal) de seis cães que receberam a administração intraprostática de 500 U de toxina botulínica do tipo A (Grupo III)..... 52
- Figura 6. Imagem ultrassonográfica longitudinal (A) e transversal (B) prostática de um cão (GIII) antes do tratamento. Ultrassonografia longitudinal (C) e transversal (D) da próstata após 8 semanas da administração de 500 U de toxina botulínica. Imagem ultrassonográfica longitudinal (E) e transversal (F) na 16ª semana após o início do tratamento; observar a estabilidade das variáveis.... 53
- Figura 7. Representação gráfica das médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos (comprimento craniocaudal, altura dorsoventral e largura transversal) de seis cães que receberam a administração intraprostática de 500 U de toxina botulínica do tipo A associada a ingestão oral de 5 mg de finasterida (Grupo IV)..... 55
- Figura 8. (A) Fotomicrografia de tecido prostático tratado com toxina botulínica A associada a finasterida. Observar generalizado aumento do compartimento estromal (setas). (B) Tecido prostático de um cão do grupo IV submetido a marcação de núcleos apoptóticos (TUNEL). Observar generalizada morte celular (pontos verdes)..... 56

CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPROSTÁTICA DE TOXINA BOTULÍNICA DO TIPO A SOBRE O TAMANHO DA PRÓSTATA E FERTILIDADE EM RATOS SPRAGUE-DAWLEY

Figura 1. Representação gráfica dos valores médios $\pm$ desvios padrão do número de filhotes nascidos no grupo I e II antes e após a administração de solução fisiológica ou toxina botulínica A intraprostaticamente.....78

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. DESCRIÇÃO ANATÔMICA, FUNCIONAL E HISTOLÓGICA DA PRÓSTATA

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

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

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

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

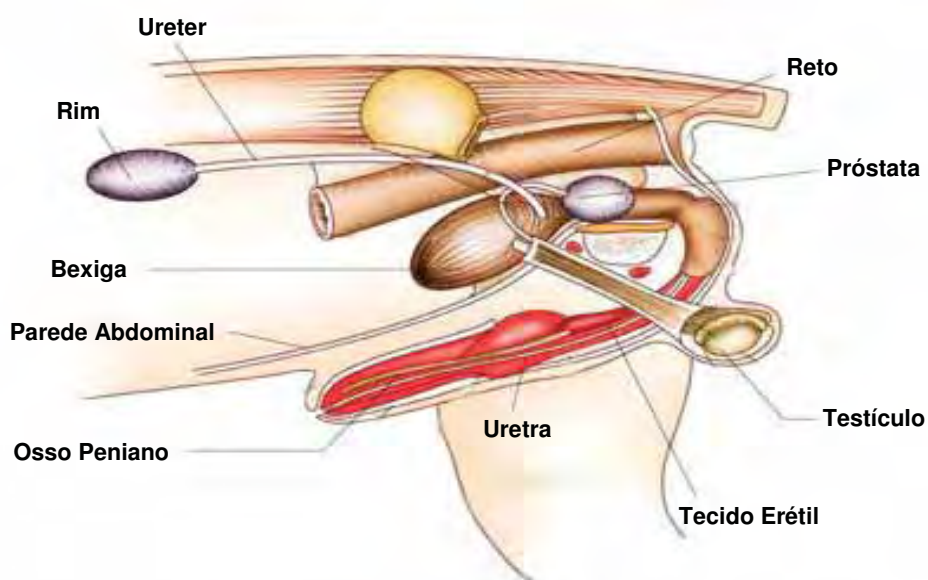


Figura 1. Representação esquemática da anatomia do aparelho reprodutor masculino e localização da glândula prostática em cães (Adaptado de <http://www.pfizerah.com>).

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

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

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

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

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

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

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

2. HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA (HPB)

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

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

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

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

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

O desenvolvimento, maturação, função e progressão do tecido prostático à hiperplasia não estão totalmente elucidados; entretanto três características desta afecção são bem definidas. Em primeiro lugar o crescimento prostático é influenciado por hormônios testiculares, sendo que este não ocorre em animais castrados. Segundo, o envelhecimento é um dos fatores, entretanto mesmo que as manifestações clínicas se iniciem normalmente em indivíduos mais velhos, o processo patológico que deu origem aos sintomas pode ter se iniciado anos antes. Por último, apenas o cão e o homem desenvolvem HPB, sugerindo que exista uma especificidade marcante nestas espécies (WILSON, 1980).

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

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

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

BERRY et al. (1986) sugerem que outros fatores possam estar envolvidos no desenvolvimento da HPB, pois é notório que o crescimento prostático continua com o

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

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

Uma das teorias em relação à patogenia da HPB sugere que o controle do crescimento prostático seja influenciado por fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores de crescimento, que são potentes mediadores da proliferação, diferenciação e apoptose celular, estariam relacionados com a parte intrínseca do processo. Dentre eles destacam-se os fatores de crescimento de ceraticócitos (KGF) e o transformador β (TGF- β). O KGF é um importante fator de crescimento e está localizado predominantemente nos fibroblastos. O TGF- β está presente nas células musculares lisas, sendo um potente inibidor do epitélio prostático, induzindo apoptose celular (LEE et al., 1997). JANULIS & LEE (1999) descreveram que as células epiteliais da próstata possuem receptores para estes dois fatores, indicando que na glândula normal este

mecanismo está em equilíbrio. Entre os fatores extrínsecos, podem-se incluir a presença de testículos funcionais, fatores ambientais e genéticos, além da produção de andrógenos por outros órgãos como a adrenal (LEE et al., 1997).

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

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

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

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

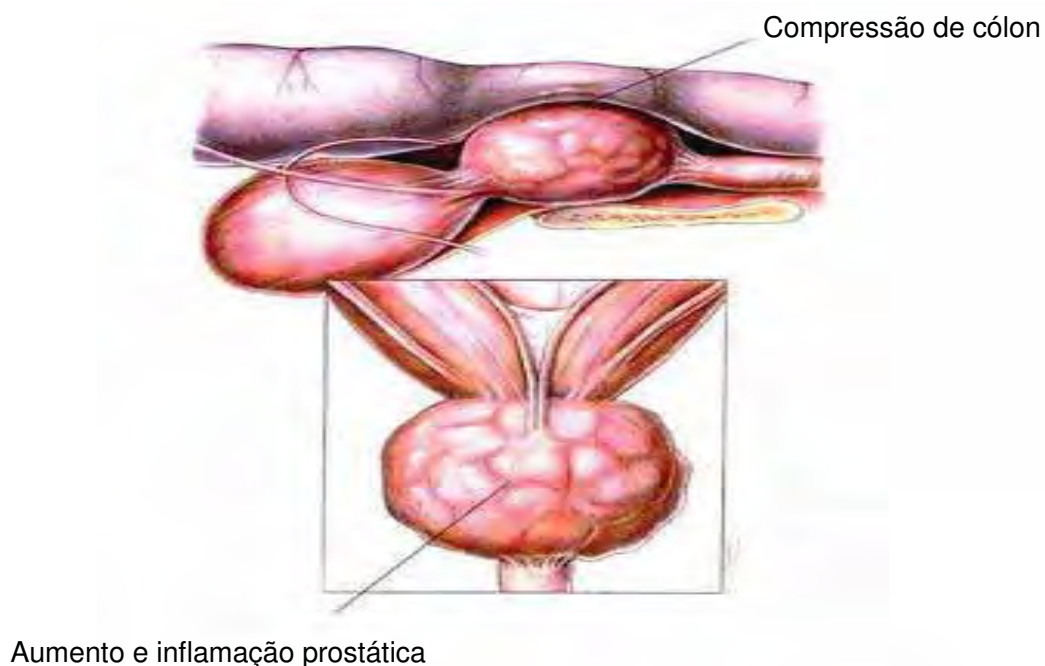


Figura 2. Representação esquemática das principais alterações prostáticas que propiciam o surgimento dos sinais clínicos em cães (Adaptado de <http://www.smallanimalclinic.com>).

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

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

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

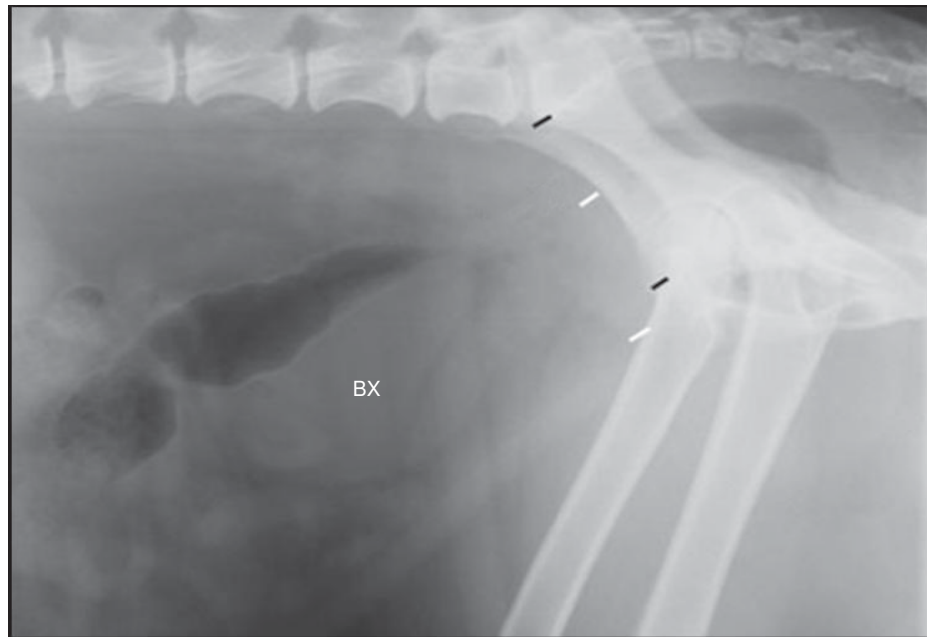


Figura 3. Imagem radiográfica de cão em projeção laterolateral direita da região caudal do abdômen com aumento prostático. Visibilização de deslocamento cranial da bexiga (BX) e dorsal do cólon. Notar discreta posição abdominal da próstata (traços brancos), sendo que esta apresenta aumento superior a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

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

O diagnóstico definitivo de HPB deve ser realizado pela biopsia da próstata. A aspiração prostática guiada por ultrassom pode ser realizada pelas vias transabdominal e periretal, sendo a primeira mais indicada (JOHNSTON et al., 2001). Na hiperplasia prostática benigna nota-se grande número de células semelhantes as normais, com citoplasma basofílico e com aumento nuclear em relação ao citoplasma (MUZZI, 1998).

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

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

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

Os progestágenos, como o acetato de megestrol, acetato de medoxiprogesterona e acetato de clormadinona, atuam na hipófise promovendo diminuição da liberação de gonadotrofina e decréscimo da concentração sérica de testosterona. Acetato de megestrol na dose de 0,5 mg/kg diariamente por quatro a oito semanas promove redução prostática (JOHNSTON et al., 2001). BAMBERG-THALÉN & LINDE-FORSBERG (1993) relataram que após a administração de 3 a 4 mg/kg (SC) de acetato de medoxiprogesterona, com doses sucessivas injetadas com intervalo mínimo de 10 semanas, ocorreu resolução dos sinais clínicos em 84% dos cães, e destes 63% não apresentaram sinais de doença prostática após 10 meses. Os autores

ainda observaram diminuição do tamanho prostático em 53% dos animais após quatro a seis semanas.

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

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

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

O acetato de delmadinona, que atua como antiandrógeno, possui pouca eficácia, apresentando excelentes resultados em somente dois de nove cães tratados (READ & BRYDEN, 1995). COURT et al. (1998) avaliando os efeitos deste fármaco sobre a função hipofisária, tolerância à glicose e hormônio do crescimento, descreveram que após a administração de 1,5 mg/kg ocorreu substancial supressão da concentração

plasmática do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), podendo esta diminuição causar sinais de insuficiência de glicocorticoides.

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

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

A concentração sérica de DHT e o volume do sêmen diminuem após o uso de finasterida (COHEN et al., 1995; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 1997; SIRINARUMITR et al., 2001). IGUER-OUADA & VERSTEGEN (1997) descreveram significativa redução do volume seminal a partir da oitava semana de tratamento,

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

Recentemente, estudos têm demonstrado a utilidade da toxina botulínica no tratamento da hiperplasia prostática benigna em ratos, humanos e cães (DOGGWEILER et al., 1998; MARIA et al., 2003; KUO, 2005; CHUANG, 2006a; MOSTACHIO, 2008; MOTHEO, 2009).

3. TOXINA BOTULÍNICA DO TIPO A

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

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

A é mais amplamente estudado para fins terapêuticos (DRESSLER et al., 2005). Os sorotipos possuem similaridade funcional, estrutural e suas seqüências de aminoácidos mostram elevado grau de homologia. Quanto às diferenças entre os sorotipos, relacionam-se ao sítio de atuação, potência e duração do efeito. A toxina botulínica do tipo A é a mais potente, de efeito mais prolongado e mais facilmente obtida em cultura, sendo a primeira a ser isolada na forma cristalina, estável e altamente purificada (HUANG et al., 2000b).

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

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

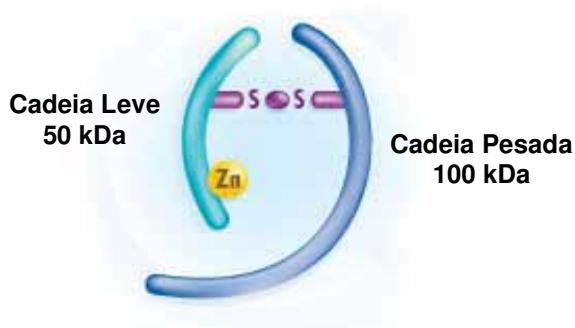


Figura 4. Representação esquemática da estrutura molecular da toxina botulínica (Adaptado de <http://btxa.com>).

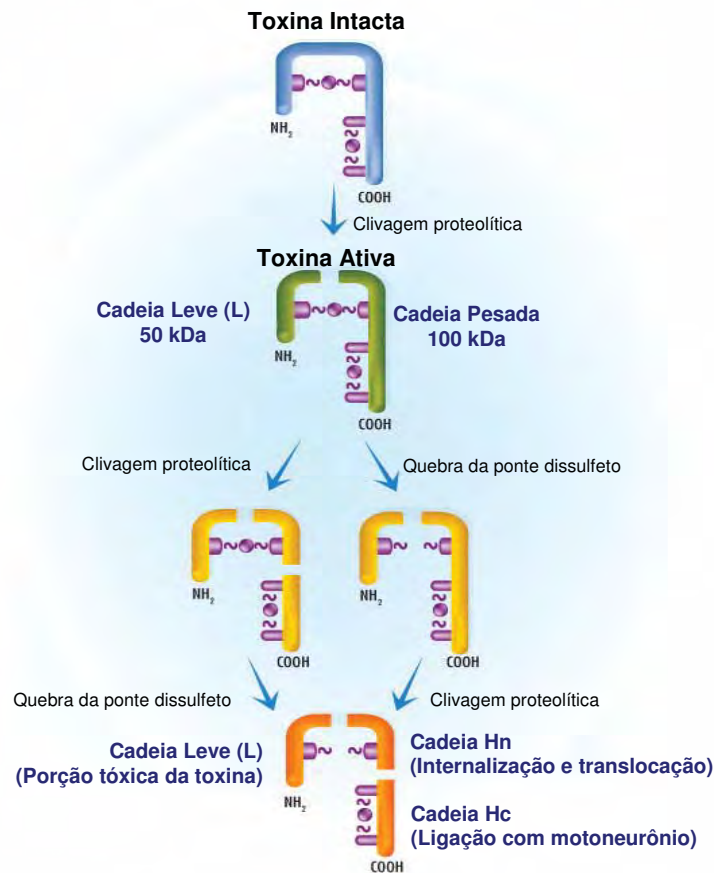


Figura 5. Representação esquemática da clivagem da toxina botulínica e suas respectivas subunidades e funções (Adaptado de <http://btxa.com>).

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

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

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

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

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

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

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

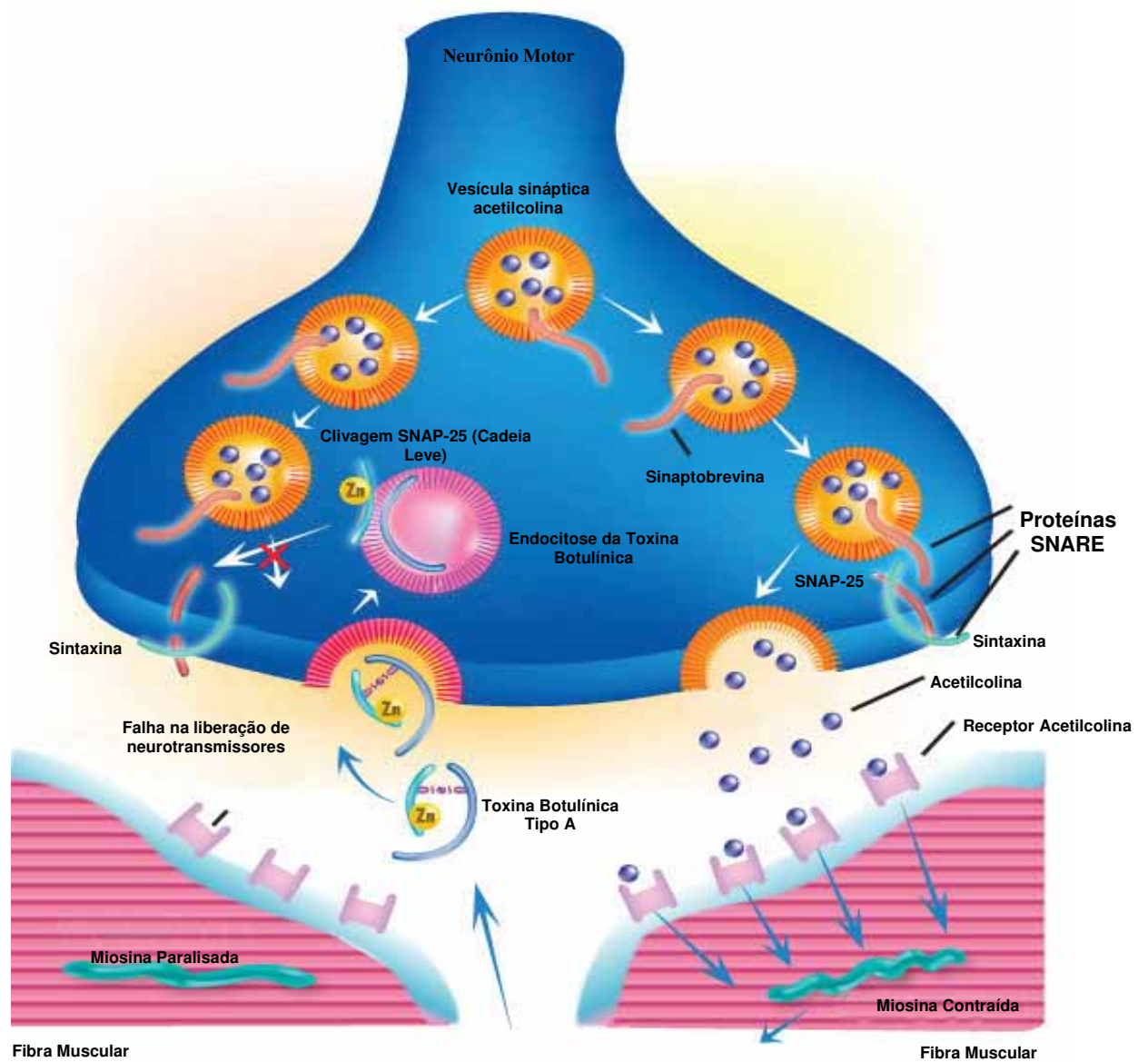


Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de ação da toxina botulínica do tipo A (Adaptado de <http://btxa.com>).

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

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

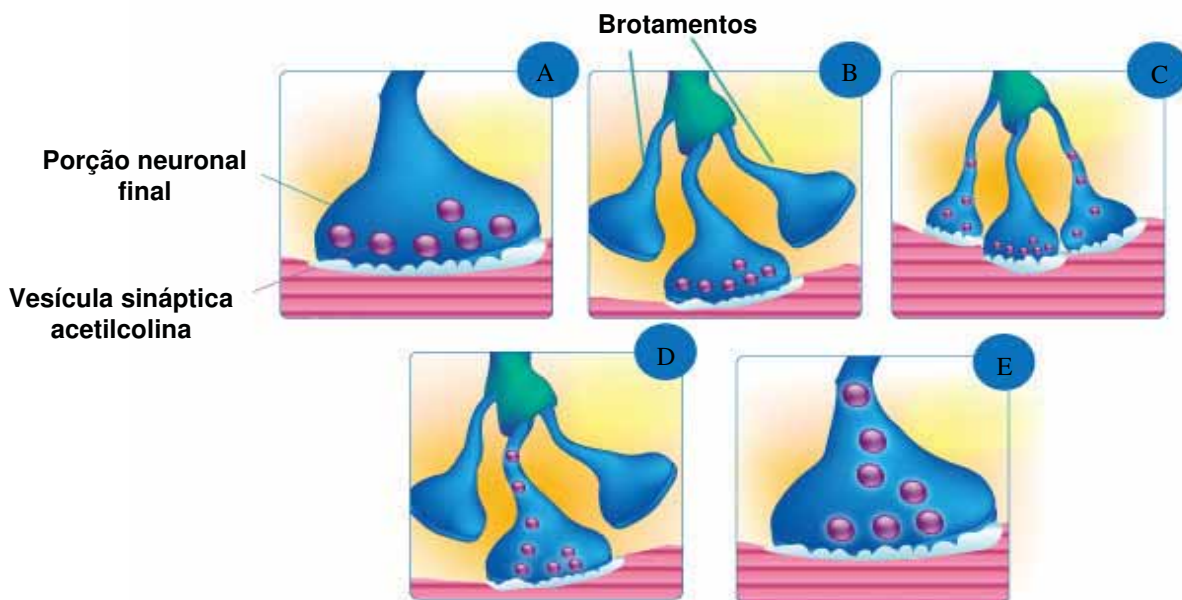


Figura 7. Representação esquemática da denervação química produzida pela toxina botulínica do tipo A. A) Acúmulo de vesícula sináptica. B) Desenvolvimento de brotamentos axonais laterais, provenientes da terminação nervosa original em direção aos nódulos de Ranvier. C) Junção neuro-muscular parcialmente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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Estudo avaliando cães com HPB (MOSTACHIO, 2008), demonstrou remissão dos sinais clínicos em média duas semanas após a administração intraprostática de 250 ou 500 U de toxina botulínica A, assim com maior homogeneidade do parênquima do órgão quando avaliado pela ultrassonografia. Nesse mesmo estudo, observou-se

ainda que a dose de 500 U de neurotoxina (Dysport®) apresentou melhores resultados quando comparada a uma menor dose (250 U) e promoveu uma redução significativa dos parâmetros prostáticos avaliados (comprimento, altura, largura e volume), sendo esta a dose preconizada para o início da terapia de animais com HPB.

O primeiro estudo referente aos efeitos da toxina botulínica A sobre a ereção, libido e qualidade seminal de cães com hiperplasia prostática benigna foi conduzido em 2008 (MOSTACHIO, 2008). Nessa pesquisa, evidenciou-se que a toxina botulínica nas doses de 250 ou 500 U não acarretaram mudanças significativas nas concentrações séricas de testosterona e DHT, na libido, na ereção e também nas características (volume, vigor, motilidade, concentração por mL, concentração total e pH) e morfologia espermática. Dando continuidade a esse experimento, MOTHEO (2009) avaliou o sêmen e o plasma seminal de cães após a administração de 250 e 500 U de TB-A. Com base nos resultados obtidos concluiu-se que a membrana plasmática dos espermatozoides manteve-se preservada após a administração da toxina e que a aplicação do fármaco não resultou em mudanças significativas nos parâmetros espermáticos como, volume, vigor, motilidade, concentração e morfologia espermática. Demonstrou-se ainda, que o perfil bioquímico e eletroforético das proteínas do plasma seminal mantiveram-se inalterados.

Sendo assim, novos e conclusivos estudos clínicos e experimentais sobre as propriedades da toxina botulínica A e da sua associação a outros produtos são necessários para assegurar a possibilidade do uso desse fármaco no tratamento de pacientes com HPB.

CAPÍTULO 2 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE FINASTERIDA E TOXINA BOTULÍNICA DO TIPO A ASSOCIADA OU NÃO A FINASTERIDA NO TRATAMENTO DA HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA DO CÃO

RESUMO - A hiperplasia prostática benigna (HPB) tem início no animal com um a dois anos de idade, no entanto, sua fisiopatologia não está totalmente compreendida. O objetivo principal do tratamento da HPB é controlar o crescimento do órgão, prevenir complicações e efeitos colaterais. Desta maneira, o efeito da toxina botulínica tem sido investigado, mostrando bons resultados no homem. Com base nisso, este estudo objetivou fornecer informações acerca dos efeitos da finasterida e da TB-A no tratamento da HPB canina. Para tanto, 24 cães adultos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos e submetidos à administração de solução fisiológica 0,9%, 5 mg de finasterida, 500 U de TB-A ou 500 U de TB-A associada a finasterida, e avaliados durante 16 semanas. Complicações locais ou alterações sistêmicas não foram observadas nos animais pertencentes aos grupos experimentais. Após 16 semanas da administração de 5 mg de finasterida o volume prostático reduziu 45,3% e ocorreu um aumento de 5 vezes nas taxa de morte celular. Comparando-se os valores do volume prostático após 16 semanas da aplicação de 500 U de TB-A ou 500 U de TB-A associada a finasterida com os valores basais, observamos uma redução de 30,9 e 51,3%, respectivamente. Neste mesmo período, ocorreu um aumento de seis e oito vezes da taxa de apoptose nos animais do grupo III e IV. Os resultados sugerem que os três protocolos terapêuticos promovem significativa redução do volume prostático e esta se deve a apoptose celular ao invés de necrose. Desta forma, o presente ensaio contribui de forma singular e inovadora para o conhecimento dos efeitos desta nova modalidade de tratamento na HPB canina.

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

CHAPTER 2 - EFFECTS OF THE ADMINISTRATION OF FINASTERIDE AND BOTULINUM TOXIN TYPE A ASSOCIATED OR NOT WITH FINASTERIDE IN TREATMENT OF DOGS WITH SPONTANEOUS BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA

SUMMARY – Benign prostatic hyperplasia (BPH) starts the development in animals aging about 1 – 2 years, however, its pathophysiology is not fully elucidated. The main goal of BPH is to control the growth of the prostate, to prevent complications, and to minimize the adverse effects. Thus, the effect of botulinum toxin A (BT-A) has been investigated in humans with good results. Based on that, this study aimed to provide information about the effects of finasteride and BT-A in the treatment of BPH in dogs. For that, 24 adult dogs were randomly divided in four groups and submitted to administration of saline solution, 5 mg of finasteride, 500 U of BT-A or 500 U of BT-A associated with finasteride, and evaluated along 16 weeks. Local complications and systemic effects were not observed. After 16 weeks of the application of 5 mg of finasteride the prostatic volume decreased 45,3% and occurred a 5-fold increase in the rate of cell death. Comparing the values of the prostatic volume after 16 weeks of administration of 500 U of BT-A or 500 U BT-A associated with finasteride with the baseline, a decrease of 30,9 and 51,3% were observed, respectively. In the same period, a increase of 6 and 8 times occurred in the rate of apoptosis in the animals of group III and IV. The results suggest that all 3 treatment protocols further significant reduction in the prostate volume have shown to significantly reduce the volume of prostate, and this reduction is due apoptosis instead necrosis. This way, the present study is an innovative and singular contribution for the knowledge of the effects of BT-A on canine prostate.

Keywords: Benign Prostatic Hyperplasia, Botulinum Toxin A, Dog, Finasteride, Prostate.

1. INTRODUÇÃO

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

A etiologia e patogênese da doença em ambas as espécies é incerta, no entanto, pesquisas demonstraram que a próstata está sob influência da inervação autonômica e aos seus neurotransmissores. Evidências demonstram que a acetilcolina promove a estimulação do crescimento da próstata, assim como a secreção de substâncias por parte desta. Por outro lado, a noradrenalina induz a contração do órgão (PENNEFATHER et al., 2000; VENTURA et al., 2002). Por essas razões, estudos tem sugerido que a toxina botulínica do tipo A é efetiva o suficiente para controlar os componentes mecânicos e dinâmicos da hiperplasia prostática benigna (DOGGWEILER et al., 1998; MARIA et al., 2003; KUO, 2005; CHUANG et al., 2006a).

A orquiectomia bilateral é o tratamento de escolha para os cães acometidos, no entanto, naqueles destinados à reprodução ou onde há contraindicação, a terapia conservativa é de grande importância. Em pacientes humanos, o tratamento a base de fármacos é a principal terapia, devido a problemas que procedimentos cirúrgicos podem ocasionar principalmente nos que apresentam coagulopatias ou severas alterações cardíacas, pulmonares e renais. Nestes, a administração de toxina botulínica do tipo A intraprostaticamente, tem propiciado excelentes resultados, com uma rápida e segura redução do volume do órgão e da resistência uretral, podendo ficar a regressão da próstata entre 20 e 54,7%. Melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes

também foi relatada, além de ser adequada naqueles com riscos por problemas pré-existentes (MARIA et al., 2003; KUO, 2005).

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

Vale também ressaltar que grande parte dos fármacos utilizados na terapia conservativa provocam efeitos colaterais indesejáveis, entre eles: redução do volume seminal, diminuição da motilidade espermática, aumento de anomalias morfológicas e indução de alterações fetais. Portanto, em cães destinados à reprodução ou utilizados em programas de criopreservação de gametas, assim como em canídeos selvagens, a toxina botulínica A poderia ser uma alternativa.

2. OBJETIVOS

Investigar o efeito da finasterida sobre a hiperplasia prostática benigna canina.

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

Analisar e pesquisar os efeitos dos tratamentos sobre a composição estrutural da próstata e os índices de apoptose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados vinte e quatro (24) machos não castrados da espécie canina, sem raça definida, pesando $16,7 \pm 9,1$ (média $\pm$ desvio padrão), com idade entre quatro e 10 anos ($6,5 \pm 2,4$), atendidos no Setor de Reprodução e Obstetrícia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal – UNESP, os quais possuíam sintomatologia clínica compatível com alterações prostáticas (gotejamento de fluído uretral não associado à urina, hematúria, tenesmo, fezes com formato laminar) e que ao exame ultrassonográfico apresentaram diagnóstico presuntivo de hiperplasia prostática benigna. Todos os cães foram submetidos previamente e ao término do experimento a exame clínico detalhado, sendo amostras sanguíneas e urinárias coletadas para avaliação hematimétrica, bioquímica (ALT e creatinina), além de urinálise. Os animais foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

Os cães foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais contendo seis animais cada. No grupo 1 (GI), os animais receberam solução fisiológica 0,9%, dividida em duas aplicações de igual volume (2 mL), administradas em cada lobo prostático. No grupo 2 (GII), os animais receberam a administração pela via oral de uma cápsula de 5 mg de finasterida diariamente durante 16 semanas. No grupo 3 (GIII), os cães receberam 500 unidades (U) cada de toxina botulínica do tipo A¹, dividida em duas aplicações de igual volume (2 mL ou 250 U), aplicadas em cada lobo prostático. Naqueles pertencentes ao grupo 4 (GIV), os mesmos procedimentos descritos para o GIII foram realizados, no entanto, estes ainda receberam a administração pela via oral de 5 mg de finasterida diariamente durante 16 semanas.

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

3.2. Procedimento Anestésico

Os cães dos grupos I, III e IV foram pré-medicados com levomepromazina¹ (1 mg/Kg, IM) e meperidina (3 mg/Kg, IM) associados na mesma seringa. Após 15 minutos, a anestesia foi induzida com propofol² na dose de 5 mg/Kg de peso corpóreo para a intubação orotraqueal, que foi procedida utilizando-se sonda de Magil de diâmetro adequado ao porte do animal. Posteriormente, os animais foram mantidos com anestesia geral inalatória (isofluorano³) diluída em 100% de oxigênio e fluxo de 30 mL/Kg/min em circuito com reinalação parcial de gases sob ventilação espontânea.

3.3. Toxina Botulínica do Tipo A

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

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

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

Em virtude da maior parte das pesquisas urológicas serem realizadas utilizando a medicação BOTOX[®] e a dose de 100 ou 200 U, e neste experimento estar-se usando a medicação DYSPORT[®], realizou-se a equivalência dos produtos empregando a taxa de conversão de 1 unidade de BOTOX[®] para cada 2,5 unidades de DYSPORT[®] (ROSALES et al., 2006), promovendo desta maneira o uso da mesma dose

¹ Neozine[®] - Sanofi Aventis – São Paulo – Brasil

² Diprivan[®] - AstraZeneca – São Paulo – Brasil

³ Forane[®] - Abbott Laboratórios do Brasil Ltda – São Paulo – Brasil

preconizadas pelos trabalhos científicos avaliados, entretanto, utilizando a dose de 500 unidades da toxina botulínica do tipo A.

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

3.3.1. Técnica de Aplicação

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

Após anestesia, tricotomia da região pré-escrotal e antissepsia, os animais foram acomodados em decúbito dorsal. Com o auxílio do aparelho de ultrassom, a glândula prostática foi identificada por via transabdominal. Ato contínuo, introduziu-se agulha de calibre (60x10 ou 80x10 mm) adequado ao porte do animal no interior da próstata, e cada lobo dos animais do GIII e GIV receberam 250 U ou 2,0 mL de toxina botulínica A, totalizando 500 U. Afim de facilitar a administração da toxina botulínica, procedeu-se a fixação digital do órgão por palpação retal. Uma aplicação de Penicilina G-Benzatina (40.000 UI/Kg, SC) foi realizada imediatamente após o procedimento.

3.4. Mensuração do Diâmetro e Volume Prostático

Antes e após quatro, oito e 16 semanas da realização dos tratamentos, os cães foram submetidos ao exame radiográfico da região abdominal caudal e ultrassonográfico da próstata.

3.4.1. Radiografia Simples e Uretrocistografia Retrógrada

Os animais foram submetidos aos exames radiográficos simples e contrastados (uretrocistografia retrógrada). Para tal foi utilizado um aparelho de raios-X com potência

máxima de 600 mA e 125 Kvp, provido de colimador luminoso e mesa de tempo móvel com grade de Potter-bucky, chassi radiográfico com ecrans verde, filmes radiográficos 18x24 cm, 24x30 cm, 30x40 cm ou 35x45 cm e proteção radiográfica como avental, protetor de tireóide e luvas plumbíferas.

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

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

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

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

A uretrocistografia retrógrada teve como objetivo delimitar a simetria glandular periuretral, a regularidade da superfície interna da uretra e o refluxo prostático anormal. A técnica e os critérios de avaliação da uretra prostática foram feitos com base no estudo de JOHNSTON et al. (1991).

3.4.2. Ultrassonografia Prostática

Mantendo os cães em decúbito dorsal, procedeu-se a ultrassonografia por via transabdominal, utilizando um aparelho de ultrassom¹ com modo bidimensional em escala de cinza e transdutores microconvexo de 5,0MHz e 7,5MHz, a fim de obter, de cada animal, imagens longitudinais e transversais. Nessas imagens foi possível avaliar o contorno, ecotextura, homogeneidade do parênquima e mensurar o comprimento craniocaudal (C), a largura transversal (L), e a altura dorsoventral (A) da próstata. O volume prostático foi obtido através da fórmula: $\text{volume} = (1/2,6 \times C \times L \times A) + 1,8$, preconizada por SIRINARUMITR et al. (2001). Para facilitar o exame foi realizada palpação retal, com a fixação digital do órgão e os dados ultrassonográficos obtidos pelo mesmo operador (ultrassonografista).

3.5. Avaliação Anatomopatológica

Para cada grupo experimental, dois animais foram anestesiados e submetidos a laparotomia oito semanas após o início do tratamento. Através da laparotomia, a glândula prostática foi localizada e um fragmento de cada lobo do órgão foi retirado e armazenado em formol 10%.

3.5.1. Avaliação Histológica

Para análise histológica, o material foi transferido para o álcool 70%, até a retirada do excesso de fixador. Após a retirada do fixador, os fragmentos foram

¹ Águila Vet – Esaote PieMedical – Holanda.

desidratadas em série crescente de etanol (70–100%), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina plástica. As secções histológicas foram obtidas em micrótomo automático, obtendo-se cortes de 5µm em sequência semi-seriada (1corte/100µm desprezados). Os cortes foram corados em hematoxilina-eosina segundo a metodologia de BEHMER et al. (1976). O processamento histológico foi realizado no setor de Técnicas Morfológicas do Laboratório de Histologia da FCAV/UNESP.

3.5.2. Avaliação in situ da apoptose via TUNEL

Para avaliar a apoptose em células prostáticas foi realizado o método do TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling). O princípio desse método se baseia na clivagem do DNA genômico durante a apoptose, quebrando-o em dois segmentos, um com alto e outro com baixo peso molecular do DNA (mono e oligonucleossomos respectivamente). Esses fragmentos livres podem ser identificados por marcador livre 3'-OH terminal com nucleotídeos modificados através de uma reação enzimática. A reação do TUNEL preferencialmente marca segmentos de DNA clivados durante a apoptose. Esse procedimento permite discriminar a apoptose da necrose e das clivagens primárias de DNA induzidas por drogas citostáticas ou por irradiação. O TUNEL pode sofrer interferências, apresentando resultados falso-negativos ou falso-positivos. Os falso-negativos ocorrem, pois o DNA clivado pode ser isento ou incompleto em algumas formas de apoptose. Isso acontece, pois certos componentes da matriz extracelular podem prevenir o acesso do TdT aos segmentos de DNA. Os falso-positivos acontecem, pois a fragmentação extensiva do DNA pode advir em estados tardios de necrose.

As fitas de DNA também podem ser proeminentes em populações de células com alto grau de proliferação ou atividade metabólica. Nesses casos, é possível obter um resultado falso-positivo. Para confirmar o processo apoptótico de morte celular, a morfologia dessas respectivas células deve ser examinada com muito cuidado. As mudanças morfológicas durante a apoptose tem uma característica padrão, tornando a

avaliação da morfologia celular um parâmetro importante nas situações em que algumas ambiguidades na interpretação dos resultados.

O ensaio de TUNEL foi realizado utilizando o kit "In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein"¹. Cortes histológicos colados em lâminas revestidas por organosilano obtidos na oitava semana de tratamento, foram desparafinizados, hidratados e permeabilizados em solução de Proteinase K 20 µg/mL diluído em tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,4 e incubadas por 10 minutos a 37°C em câmara úmida. As lâminas empregadas como controle foram incubadas com Dnase I (10 U/µL) diluída em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5 por 30 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida. Em seguida, ao abrigo da luz, os cortes foram incubados com solução de TUNEL (enzima TdT-Terminal deoxynucleotidyl Transferase) na diluição 1:10 entre os reagentes A (Enzyme Solution) e B (Label Solution) do kit, seguindo-se a orientação do fabricante por 1:30 horas a 37°C em câmara úmida. A lâmina do controle negativo foi incubada somente com o reagente B, omitindo-se o reagente A.

Posteriormente, os cortes foram lavados 3 vezes em tampão PBS pH 7,3 por 10 minutos. As lâminas foram secas e montadas em Prolong antifade. A visualização foi realizada em microscópio de fluorescência com filtro para fluoresceína em aumento de 40 vezes. Foram avaliados 500 núcleos (células) por lâmina para expressar o índice de apoptose, sendo o número de células apoptóticas expresso em relação ao número total de células contadas.

3.6. Análise Estatística

No experimento foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos e seis animais por tratamento, totalizando 24 animais. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *t* de Student pareado, empregado para comparação de médias entre os diferentes tempos dentro do mesmo grupo.

¹ Roche Applied Science – Alemanha.

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

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

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

4. RESULTADOS

Os 24 animais selecionados para compor os grupos experimentais apresentavam sinais clínicos, radiográficos e ultrassonográficos compatíveis com hiperplasia prostática benigna. Os principais sinais clínicos observados antes do início dos tratamentos foram: hematúria, sangramento espontâneo pelo pênis e dificuldade de defecação, correspondendo estes a 55, 23 e 15% das alterações, respectivamente.

Segundo os dados obtidos durante a realização do experimento, os sinais clínicos observados pelos proprietários cessaram em média após duas semanas da administração da medicação. Este resultado foi semelhante quando comparado o GII (finasterida), GIII (toxina botulínica A) e GIV (toxina botulínica A + finasterida). No entanto, os animais pertencentes ao grupo I não apresentaram melhora do quadro clínico e os sinais permaneceram variáveis durante as 16 semanas de avaliação.

Os demais resultados obtidos no presente ensaio estão apresentados distintamente em três partes. A primeira refere-se aos animais que receberam a administração de solução fisiológica 0,9% (Grupo I - controle). A segunda parte refere-se aos cães que receberam 5 mg de finasterida. A terceira parte engloba os achados da administração de 500 U de toxina botulínica do tipo A isoladamente ou associada a finasterida nos grupos III e IV, respectivamente.

4.1. Análise dos Animais Tratados com Solução Fisiológica 0,9%

4.1.1. Mensuração do Diâmetro e Volume Prostático

4.1.1.1. Avaliação Radiográfica

Ao exame radiográfico simples o aumento de volume prostático foi visibilizado pelo deslocamento cranial da bexiga e deslocamento dorsal do cólon. Exceto em um animal onde a próstata não foi visibilizada, todos os outros cães apresentaram

dimensões prostáticas craniocaudais na projeção radiográfica laterolateral, ultrapassando 70% da medida entre o promontório sacral e o púbis. Na uretrocistografia retrógrada também foi possível visibilizar as mesmas alterações observadas ao exame radiográfico simples, além de pequena perda de simetria da uretra prostática em dois animais do grupo I, as quais não foram visibilizadas ao final das avaliações.

O diâmetro prostático, expresso como porcentagem da medida entre o promontório do sacro e o púbis, não foi significativamente diferente entre os períodos antes do início do experimento.

A média do diâmetro prostático dos animais que receberam solução fisiológica 0,9% era de $63 \pm 5,7\%$. Nas avaliações radiográficas (simples e uretrocistografia retrógrada) dos animais do grupo I não foi possível após quatro, oito e 16 semanas notar redução da glândula prostática, assim como o seu retorno a cavidade pélvica e ausência de deslocamento do cólon. Alterações de regularidade de contorno e de densidade radiográfica, caracterizadas por distorções de radiopacidade, não foram observadas ao exame no início, durante e ao final do experimento em todos os cães do grupo I.

4.1.1.2. Avaliação Ultrassonográfica

Antes do início do tratamento, prostatomegalia e alterações do parênquima foram observadas ao exame ultrassonográfico, consistindo em aumento simétrico, ecotextura variando de lisa a áspera e ecogenicidade mista. Pequenas lesões cavitárias (cistos) intraparenquimais também foram evidenciadas pelo exame ultrassonográfico em todos os animais.

Quatro semanas após a administração da solução fisiológica 0,9%, a ultrassonografia transabdominal não revelou redução dos parâmetros volume, comprimento craniocaudal, altura dorsoventral e largura transversal da próstata. (Tabela 1). Na oitava e décima sexta semana, as variáveis observadas se mantiveram inalteradas, sendo estas não significativas quando confrontadas aos valores basais (tempo 0).

As médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos dos seis animais estudados, antes e após a administração intraprostática de solução fisiológica 0,9%, estão representados na Figura 1.

Tabela 1. Valores médios $\pm$ desvio padrão dos parâmetros prostáticos de seis cães que receberam a administração intraprostática de solução fisiológica 0,9% (Grupo I), no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2012.

Semanas	Comprimento	Altura	Largura Transversal (cm)	Volume (cm ³)
	Craniocaudal (cm)	Dorsoventral (cm)		
0	4,93 $\pm$ 0,77 ^A	3,98 $\pm$ 0,59 ^A	5,24 $\pm$ 0,43 ^A	42,27 $\pm$ 12,56 ^A
4	4,96 $\pm$ 0,72 ^A	4,01 $\pm$ 0,56 ^A	5,30 $\pm$ 0,42 ^A	43,20 $\pm$ 12,26 ^A
8	5,01 $\pm$ 0,79 ^A	4,02 $\pm$ 0,63 ^A	5,24 $\pm$ 0,43 ^A	43,36 $\pm$ 12,91 ^A
16	4,99 $\pm$ 0,71 ^A	4,04 $\pm$ 0,61 ^A	5,19 $\pm$ 0,42 ^A	43,00 $\pm$ 12,52 ^A

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

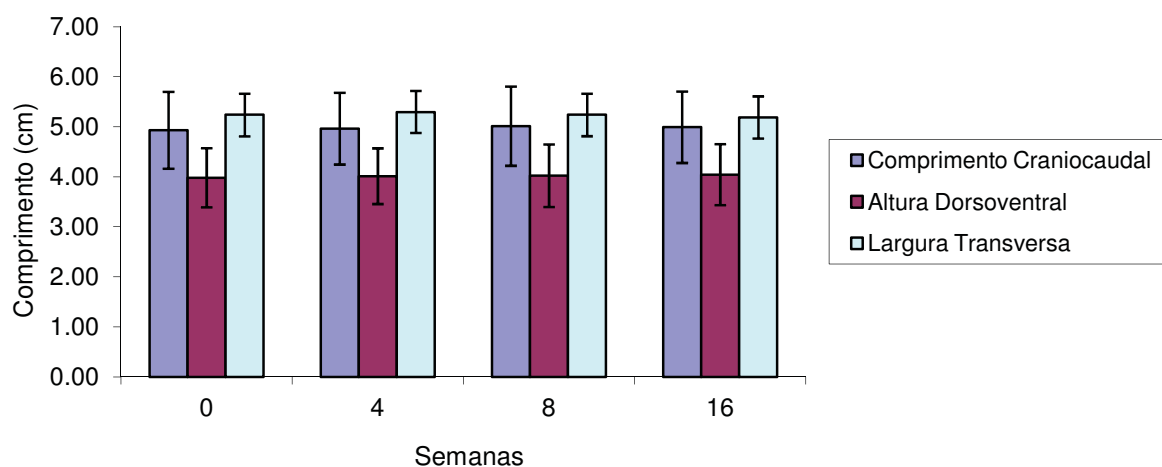


Figura 1. Representação gráfica das médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos (comprimento craniocaudal, altura dorsoventral e largura transversal) de seis cães que receberam a administração intraprostática de solução fisiológica 0,9% (Grupo I).

4.1.2. Avaliação Histológica

Histologicamente, a hiperplasia prostática benigna dos animais pertencentes ao grupo I após oito semanas da administração de solução fisiológica 0,9% foi classificada em epitelial cística (a qual apresenta ácinos glandulares dilatados, irregulares, revestidos por epitélio cúbico simples com ou sem secreção intraluminal) ou complexa (proliferação do componente epitelial e estromal) (Figura 2). Nenhum sinal de necrose foi observado.

4.1.3. Avaliação *in situ* da Apoptose via TUNEL

A mensuração da apoptose via TUNEL evidenciou pequeno grau de morte celular nas secções dos animais do grupo controle (Figura 2). Após 8 semanas do tratamento, a média de apoptose foi de $14,2 \pm 2,1$ células.

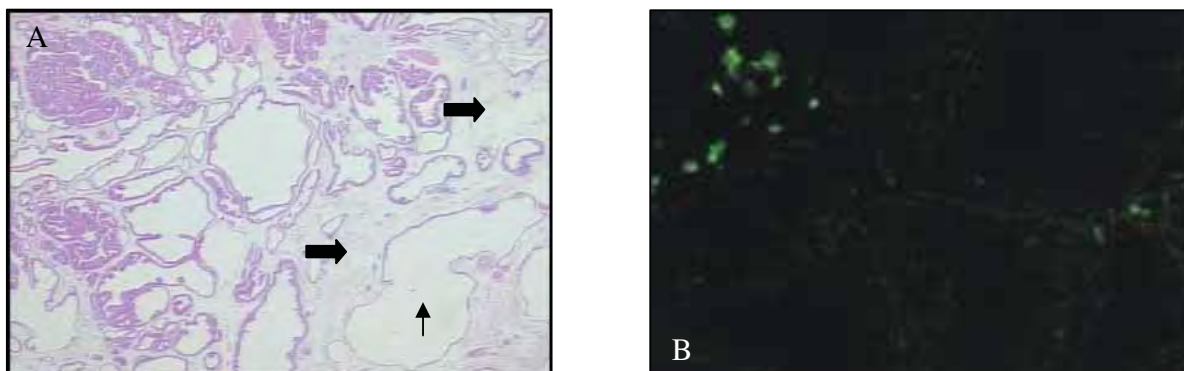


Figura 2. (A) Fotomicrografia de tecido prostático corado por hematoxilina-eosina evidenciando hiperplasia complexa (GI). Observar proliferação estromal (seta grossa) e epitelial cística (seta fina). (B) Tecido prostático tratado com solução fisiológica 0,9% submetido a marcação de núcleos apoptóticos (TUNEL). Observar pequena morte celular (pontos verdes).

4.1.4. Variações Hematimétricas, Bioquímicas e Urinálise

Os resultados hematimétricos, bioquímicos (ALT e creatinina) e urinálise obtidos dos animais no início e após oito e 16 semanas do tratamento permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie (KANEKO, 1997).

4.2. Análise dos Animais Tratados com 5 mg de Finasterida

4.2.1. Mensuração do Diâmetro e Volume Prostático

4.2.1.1. Avaliação Radiográfica e Ultrassonográfica

A média do diâmetro prostático dos animais que receberam 5 mg de finasterida foi de $58,3 \pm 7,8\%$. Após quatro semanas da administração de finasterida não foi

observada redução no diâmetro prostático. Entretanto, uma redução significativa do diâmetro após 8 e 16 semanas do início do tratamento foi notada, visibilizando valores de $46,8 \pm 3,4\%$ e $45,4 \pm 5,3\%$ respectivamente. Nenhuma alteração de contorno e radiopacidade foram notadas após as 16 semanas de tratamento.

A média do volume prostático dos animais incluídos no grupo II no início do experimento era de $34,28 \pm 12,75 \text{ cm}^3$. Após 16 semanas da administração da finasterida o volume da próstata regrediu em todos os cães pertencentes a este grupo, causando uma redução significativa de 45,3% na média do volume da glândula prostática (de $34,28 \pm 12,75$ para $18,76 \pm 7,95$, $p < 0,01$, Tabela 2). Comparando os dados obtidos para volume prostático após quatro e oito semanas com os valores basais (tempo 0), o percentual de redução alcançado foi de 33,6 e 43,0%, respectivamente.

As médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos dos seis animais estudados, antes e após a administração diária de 5 mg de finasterida, estão representados na Figura 3.

Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio padrão dos parâmetros prostáticos de seis cães que receberam a administração de 5 mg de finasterida (Grupo II), no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2012.

Semanas	Comprimento	Altura	Largura Transversal (cm)	Volume (cm^3)
	Craniocaudal (cm)	Dorsoventral (cm)		
0	$4,18 \pm 0,59^A$	$3,90 \pm 0,52^A$	$5,02 \pm 0,53^A$	$34,28 \pm 12,75^A$
4	$3,60 \pm 0,57^B$	$3,40 \pm 0,49^B$	$4,27 \pm 0,51^B$	$22,76 \pm 9,28^B$
8	$3,38 \pm 0,57^B$	$3,17 \pm 0,49^B$	$4,08 \pm 0,54^B$	$19,54 \pm 8,32^B$
16	$3,33 \pm 0,52^B$	$3,18 \pm 0,50^B$	$3,95 \pm 0,59^B$	$18,76 \pm 7,95^B$

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

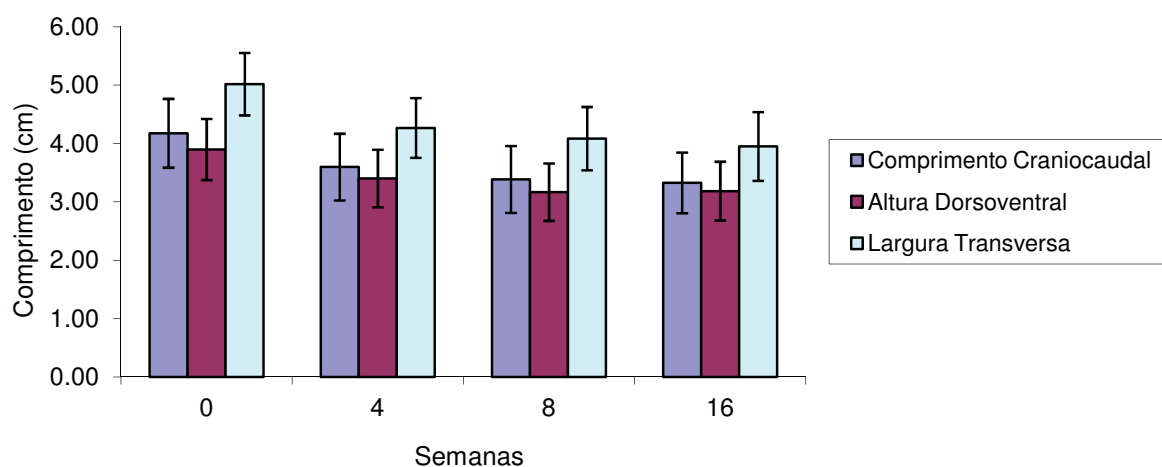


Figura 3. Representação gráfica das médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos (comprimento craniocaudal, altura dorsoventral e largura transversal) de seis cães que receberam a administração de 5 mg de finasterida (Grupo II).

4.2.2. Avaliação Histológica

Histologicamente, o tratamento com finasterida nos animais do grupo II provocou achatamento do epitélio de revestimento com diminuição do volume ocupado pelo compartimento glandular e estromal. Nenhum sinal de necrose foi observado.

4.2.3. Avaliação *in situ* da Apoptose via TUNEL

O tratamento com 5 mg de finasterida promoveu aumento significativo no índice de apoptose das células. Após 8 semanas do tratamento, a média de apoptose foi de $69,7 \pm 12,4$ células. Comparando esses dados com os obtidos no grupo controle, a administração da finasterida promoveu um aumento de 5 vezes na taxa de apoptose.

4.2.4. Variações Hematimétricas, Bioquímicas e Urinálise

Os resultados hematimétricos, bioquímicos (ALT e creatinina) e urinálise obtidos dos animais no início e após oito e 16 semanas da administração de 5 mg de finasterida permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie (KANEKO, 1997).

4.3. Análise dos Animais Tratados com Toxina Botulínica do Tipo A Isoladamente ou Associada a Finasterida

O método de administração da toxina botulínica A mostrou-se seguro e de baixa complexidade. A progressão da agulha no parênquima prostático e os locais de injeção da toxina (Figura 4) foram facilmente controlados pela ultrassonografia transabdominal.

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

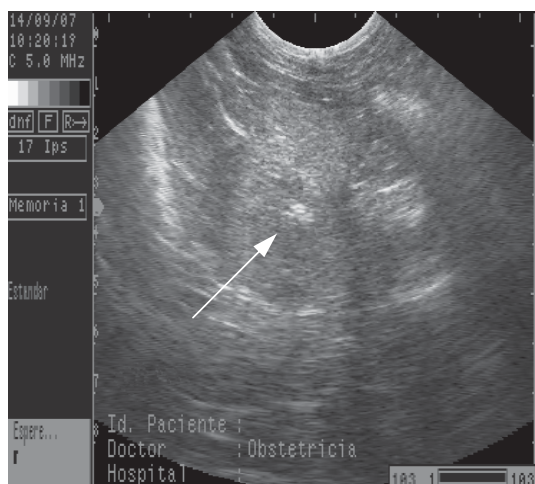


Figura 4. Imagem ultrassonográfica evidenciando área hiperecogênica (seta) no parênquima prostático canino devido a dispersão da solução de toxina botulínica do tipo A.

4.3.1. Mensuração do Diâmetro e Volume Prostático

4.3.1.1. Avaliação Radiográfica

Assim como nos animais pertencentes ao grupo I, as avaliações radiográficas dos 16 cães que compunham os grupos III e IV mostraram deslocamento cranial da bexiga e dorsal do cólon, com dimensões prostáticas superiores a 70% da medida entre o promontório sacral e o púbis. Durante a uretrocistografia retrógrada foi observado refluxo do meio de contraste para a próstata na primeira avaliação em um dos animais do grupo III, sendo este não mais identificado durante e ao final das observações.

A média do diâmetro prostático dos animais do grupo III e IV foi de $61 \pm 9,7\%$ e $68 \pm 12,9\%$, respectivamente. Igualmente como observado para os animais do grupo I, não foi possível notar visualmente a redução da glândula prostática no grupo dos animais que receberam 500 U de toxina botulínica. Este resultado possivelmente ocorreu devido a menor redução de parâmetros que a administração da neurotoxina botulínica proporcionou aos animais desse grupo. Alterações de radiopacidade e contorno não foram observados.

Diferentemente do grupo III, foi possível após 8 e 16 semanas notar visualmente redução da glândula prostática nos animais que receberam a administração de 500 U de toxina botulínica do tipo A associada a ingestão oral de 5 mg de finasterida diariamente. Após 8 e 16 semanas do tratamento, a média do diâmetro prostático era de $51,6 \pm 7,8\%$ da medida entre o promontório sacral e o púbis e de $53 \pm 6,1\%$, respectivamente. Comparando esses dados com os valores pré-tratamento, a redução foi de $24 \pm 18\%$ após 8 semanas e de $22 \pm 8,3\%$ depois de 16 semanas do início do experimento. No que se refere ao tratamento após 4 semanas, o diâmetro prostático não apresentou redução significativa.

4.3.1.2. Avaliação Ultrassonográfica

Ao exame ultrassonográfico inicial dos animais dos grupos III e IV foi visibilizado aumento prostático simétrico, micro cistos intraparenquimais e parênquima de ecogenicidade mista. Evidenciou-se que durante as 16 semanas de avaliação dos cães pertencentes aos grupos III e IV ocorreu um decréscimo das lesões cavitárias (cistos) intraparenquimais e aumento na homogeneidade do parênquima prostático. Áreas de alterações de ecogenicidade nos locais de aplicação da toxina botulínica não foram observadas durante os exames ultrassonográficos da próstata.

A média do volume prostático dos animais que receberam 500 U de toxina botulínica do tipo A (grupo III) no início do experimento foi de $32,57 \pm 8,27 \text{ cm}^3$. Após quatro semanas da administração da neurotoxina o volume da próstata regrediu em todos os cães pertencentes a este grupo, causando uma redução significativa de 26,3% na média do volume da glândula prostática (de $32,57 \pm 8,27$ para $24,00 \pm 5,98$, $p < 0,01$, Tabela 3). A altura dorsoventral da próstata também apresentou diminuição significativa após quatro semanas, passando de $4,03 \pm 0,39$ para $3,51 \pm 0,36 \text{ cm}$ ($p < 0,05$). As demais variáveis, comprimento e largura, não apresentaram reduções significativas neste período (Tabela 3).

Na oitava semana de avaliação observou-se uma mudança significativa no parâmetro comprimento prostático. Comparando os dados obtidos com os valores basais (tempo 0), a média do comprimento passou de $3,97 \pm 0,39$ para $3,48 \pm 0,32 \text{ cm}$ ($p < 0,05$, Tabela 3). As variáveis volume e altura da glândula prostática permaneceram significativamente reduzidas neste período, atingindo o volume sua redução máxima (31,7%) durante o período experimental.

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

As médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos dos seis animais estudados, antes e após a aplicação de 500 U de toxina botulínica, estão representados na Figura 5.

As imagens ultrassonográficas de um dos cães pertencente ao grupo III, demonstrando as reduções dos parâmetros comprimento, altura e largura prostática estão apresentadas na Figura 6.

Tabela 3. Valores médios $\pm$ desvios padrão dos parâmetros prostáticos de seis cães que receberam a administração intraprostática de 500 U de toxina botulínica do tipo A (Grupo III), no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2012.

Semanas	Comprimento	Altura	Largura Transversal (cm)	Volume (cm ³)
	Craniocaudal (cm)	Dorsoventral (cm))		
0	3,97 $\pm$ 0,39 ^A	4,03 $\pm$ 0,39 ^A	4,92 $\pm$ 0,43 ^A	32,57 $\pm$ 8,27 ^A
4	3,54 $\pm$ 0,36 ^{AB}	3,51 $\pm$ 0,35 ^B	4,59 $\pm$ 0,34 ^A	24,00 $\pm$ 5,98 ^B
8	3,48 $\pm$ 0,32 ^B	3,40 $\pm$ 0,33 ^B	4,43 $\pm$ 0,41 ^A	22,25 $\pm$ 5,45 ^B
16	3,50 $\pm$ 0,30 ^B	3,41 $\pm$ 0,33 ^B	4,43 $\pm$ 0,47 ^A	22,48 $\pm$ 5,67 ^B

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

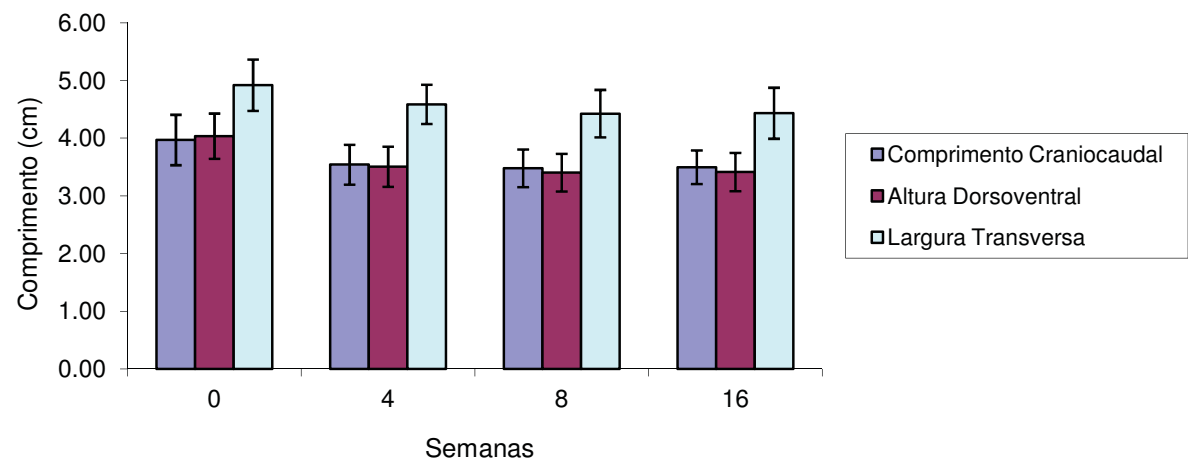


Figura 5. Representação gráfica das médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos (comprimento craniocaudal, altura dorsoventral e largura transversal) de seis cães que receberam a administração intraprostática de 500 U de toxina botulínica do tipo A (Grupo III).

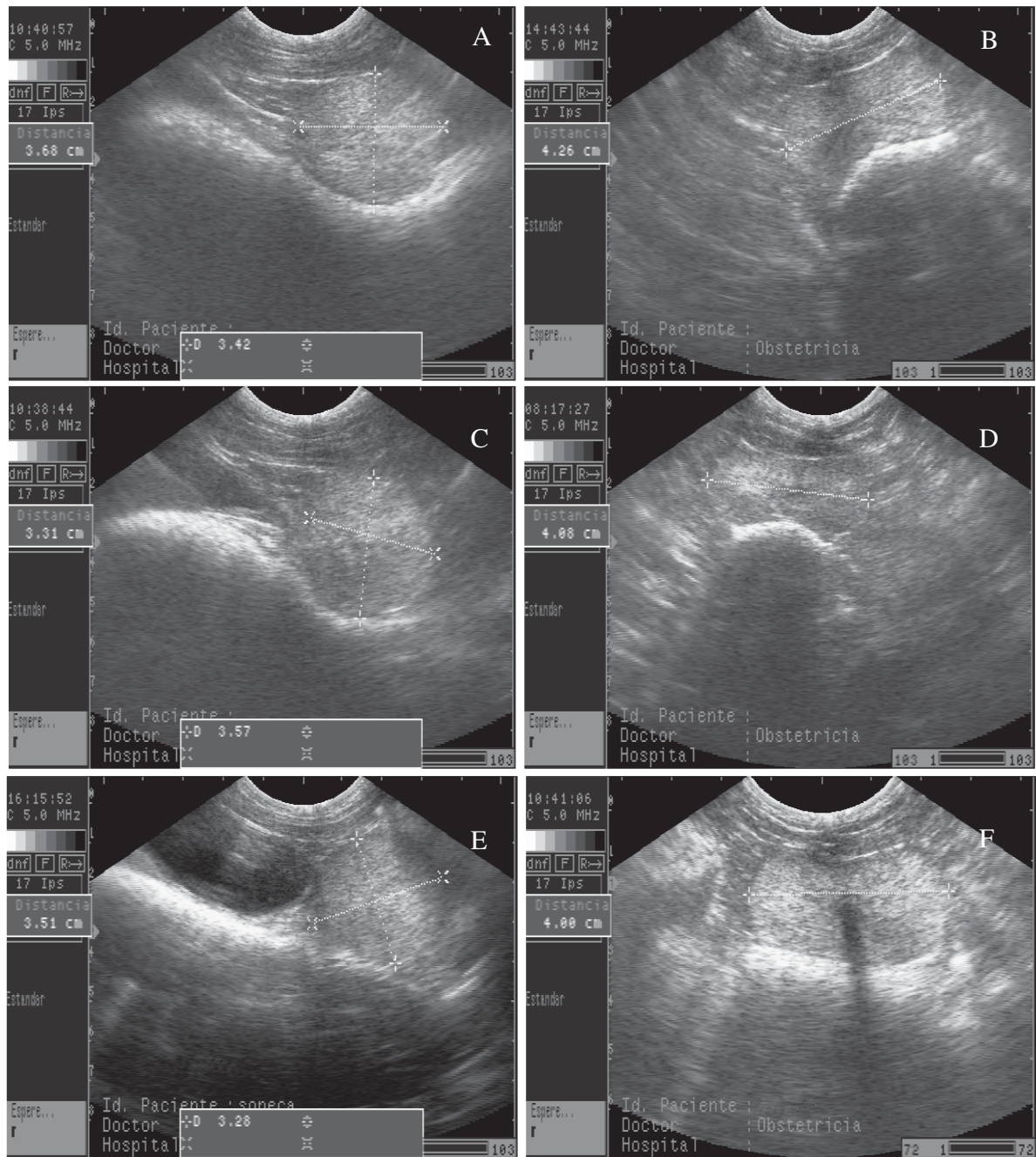


Figura 6. Imagem ultrassonográfica longitudinal (A) e transversal (B) prostática de um cão (GIII) antes do tratamento. Ultrassonografia longitudinal (C) e transversal (D) da próstata após 8 semanas da administração de 500 U de toxina botulínica. Imagem ultrassonográfica longitudinal (E) e transversal (F) na 16ª semana após o início do tratamento; observar a estabilidade das variáveis.

A administração de 500 U de toxina botulínica A associada a ingestão oral de finasterida nos animais do grupo IV provocou mudanças significativas nos parâmetros avaliados.

A média do volume prostático dos animais incluídos no grupo IV no início do experimento era de $28,09 \pm 7,20 \text{ cm}^3$. Após 16 semanas da administração da neurotoxina o volume da próstata regrediu em todos os cães pertencentes a este grupo, causando uma redução significativa de 51,3% na média do volume da glândula prostática (de $28,09 \pm 7,20$ para $13,69 \pm 2,39$, $p < 0,01$, Tabela 4). Comparando os dados obtidos para volume prostático após quatro e oito semanas com os valores basais (tempo 0), o percentual de redução alcançado foi de 42,5 e 56,3%, respectivamente.

Diferentemente do grupo III, no qual o parâmetro comprimento prostático só foi significativamente reduzido após oito semanas, essa redução já pode ser observada depois de quatro semanas nos animais do grupo IV. A associação utilizada de 5 mg de finasterida a 500 U de toxina botulínica apresentou significativa redução dos parâmetros comprimento craniocaudal, altura dorsoventral e largura transversa da próstata (Tabela 4). Confrontando os valores obtidos com os dados iniciais, a média do comprimento, altura e largura prostática apresentaram redução de 18,6% (de $3,97 \pm 0,51$ para $3,23 \pm 0,29 \text{ cm}$, $p < 0,05$), 15,1% (de $3,68 \pm 0,29$ para $3,13 \pm 0,29 \text{ cm}$, $p < 0,05$) e 21,2% (de $4,61 \pm 0,39$ para $3,63 \pm 0,26 \text{ cm}$, $p < 0,05$), respectivamente. Na oitava e décima sexta semana, as variáveis observadas sofreram novas reduções, sendo estas significativas quando confrontadas aos valores basais (tempo 0). Após 16 semanas do tratamento, obteve-se uma redução dos parâmetros comprimento, altura e largura da próstata de 23,8, 18,9 e 26,2%, respectivamente.

As médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos dos seis animais estudados, antes e após ministrar 500 U de toxina botulínica associada a ingestão oral de finasterida, estão apresentados e representados na Tabela 4 e Figura 7, respectivamente.

Tabela 4. Valores médios $\pm$ desvios padrão dos parâmetros prostáticos de seis cães que receberam a administração intraprostática de 500 U de toxina botulínica do tipo A associada a 5 mg de finasterida (Grupo IV), no período de 16 semanas. Jaboticabal – SP, 2012.

Semanas	Comprimento	Altura	Largura Transversal (cm)	Volume (cm ³)
	Craniocaudal (cm)	Dorsoventral (cm)		
0	3,97 $\pm$ 0,51 ^A	3,68 $\pm$ 0,29 ^A	4,61 $\pm$ 0,39 ^A	28,09 $\pm$ 7,20 ^A
4	3,23 $\pm$ 0,29 ^B	3,13 $\pm$ 0,29 ^B	3,63 $\pm$ 0,26 ^B	16,14 $\pm$ 3,82 ^B
8	2,88 $\pm$ 0,32 ^B	2,81 $\pm$ 0,32 ^B	3,30 $\pm$ 0,15 ^B	12,27 $\pm$ 3,03 ^B
16	3,02 $\pm$ 0,25 ^B	2,98 $\pm$ 0,24 ^B	3,40 $\pm$ 0,11 ^B	13,69 $\pm$ 2,39 ^B

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

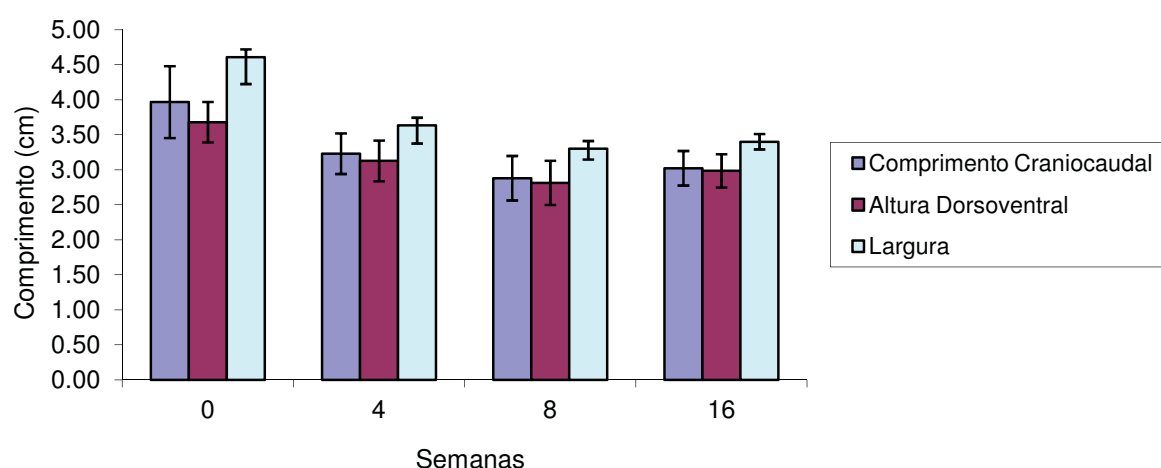


Figura 7. Representação gráfica das médias e desvios padrão dos parâmetros prostáticos (comprimento craniocaudal, altura dorsoventral e largura transversal) de seis cães que receberam a administração intraprostática de 500 U de toxina botulínica do tipo A associada a ingestão oral de 5 mg de finasterida (Grupo IV).

4.3.2. Avaliação Histológica

O tratamento por 8 semanas com toxina botulínica do tipo A associada ou não a finasterida resultou numa diminuição do compartimento glandular, área luminal e na altura da célula epitelial (Figura 8). O estroma tornou-se mais espesso em comparação com o grupo controle (GI). Nenhum sinal de necrose foi observado.

4.3.3. Mensuração *in situ* da Apoptose via TUNEL

O tratamento com toxina botulínica A associada ou não a finasterida promoveu aumento significativo ($p < 0,05$) no índice de apoptose das células (Figura 8). Após 8 semanas do tratamento, a média de apoptose foi de $83,5 \pm 17,4$ e $115,3 \pm 17,6$ células nos grupos III e IV respectivamente. Comparando esses dados com os obtidos no grupo controle, a administração da toxina botulínica A promoveu um aumento de aproximadamente 6 vezes na taxa de apoptose. No que se refere a sua associação a finasterida, a morte celular foi ainda mais expressiva aumentando em 8 vezes a taxa de apoptose.

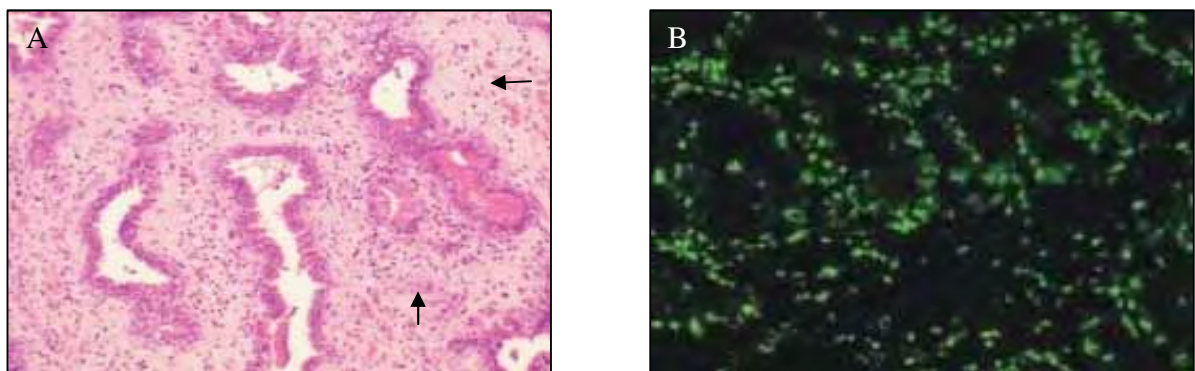


Figura 8. (A) Fotomicrografia de tecido prostático tratado com toxina botulínica A associada a finasterida. Observar generalizado aumento do compartimento estromal (setas). (B) Tecido prostático de um cão do grupo IV submetido a marcação de núcleos apoptóticos (TUNEL). Observar generalizada morte celular (pontos verdes).

4.3.4. Variações Hematimétricas, Bioquímicas e Urinálise

Os resultados hematimétricos, bioquímicos (ALT e creatinina) e urinálise obtidos dos animais pertencentes aos grupos que receberam 500 U de toxina botulínica do tipo A associada ou não a 5 mg de finasterida no início e após oito e 16 semanas permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie (KANEKO, 1997) e não apresentaram diferenças significativas.

5. DISCUSSÃO

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

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

A interpretação dos resultados obtidos sobre os efeitos da TB-A foi realizada com certa dificuldade, isto devido a pouquíssimas informações, quer na literatura veterinária, quer na relacionada à medicina humana. No que diz respeito a explicação dos resultados conseguidos com a associação toxina botulínica e finasterida esta foi ainda mais desafiadora, uma vez que o presente estudo é o primeiro a avaliar esta associação, no entanto pretende, a seguir, sugerir e agregar alguns dados relacionados ao seu uso para o tratamento da hiperplasia prostática benigna.

Como foi esperado, o tratamento dos animais com solução fisiológica 0,9% não acarretou alterações na composição histológica da glândula, no índice de apoptose e no diâmetro e volume prostático. Esses dados estão de acordo com os descritos na literatura (MARIA et al., 2003; CHUANG et al., 2006a; LIN et al., 2007) e mostram a inocuidade da solução ao tecido prostático.

Apesar do pequeno número de animais estudados que receberam a administração diária de 5 mg de finasterida, a redução do volume da glândula confirma as observações prévias descritas por outros pesquisadores (LAROQUE et al., 1994 e 1995; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 1997; SHIBATA et al., 2001; SIRINARUMITR et al., 2001). O decréscimo neste experimento não foi o mesmo atingido por LAROQUE et al. (1994), o qual conseguiu uma diminuição superior a 50%, no entanto, foi superior ao alcançado por SHIBATA et al. (2001) que relatou uma redução de 30%. Em nosso estudo, a maior regressão do volume ocorreu após 16 semanas do início do tratamento, atingindo 45,3%. Esses dados estão de acordo com os obtidos por COHEN et al. (1995), IGUER-OUADA & VERSTEGEN (1997) e SIRINARUMITR et al. (2001) que obtiveram um decréscimo entre 40 e 50% do volume prostático. Explicações possíveis para esta variedade de resultados seriam a utilização de diferentes doses de finasterida, a qual possui uma ampla variação de 0,1 a 1 mg/kg, e o tempo que os animais permaneceram sobre tratamento. Outra provável elucidação seria o fato de que diferentes indivíduos da mesma espécie apresentam disparidades individuais e assim poderia em parte explicar a vasta desigualdade de reduções obtidas sobre o volume (30 a 60%) com a utilização da mesma dose de finasterida.

No que concerne ao diâmetro prostático adquirido, comparando-se a medida da distância entre o promontório do sacro e o púbis, com a dimensão craniocaudal da próstata, os valores estão em concordância com os apresentados por SIRINARUMITR et al. (2001) que relataram uma diminuição entre 20 a 25% nesse parâmetro somente após a oitava semana de tratamento. Acreditamos que essa redução significativa só foi possível de ser notada após oito e 16 semanas no exame radiográfico devido que pequenas variações de tamanho, no caso o comprimento craniocaudal, são difíceis de serem visibilizadas no mesmo.

No presente trabalho foi notado que após o tratamento com finasterida, TB-A associada ou não a finasterida os cães apresentavam ao toque retal próstatas mais macias quando confrontadas com a primeira avaliação. DI SANTIS (2003) relatou que a maioria dos animais entre seis e 8,5 anos de idade apresentam, em relação ao tipo histológico de hiperplasia, características de aumento dos compartimentos estromal e

glandular, os quais foram confirmados nesse trabalho. Assim concluímos que essa maior suavidade e maciez do tecido prostático verificada a palpação após o uso dos fármacos está relacionada a regressão do colágeno, do estroma fibroso e também da atrofia glandular que os medicamentos produziram, alcançando este parênquima características próximas as próstatas de animais jovens. Outros estudos também ratificam nossos achados histológicos que mostram que os compartimentos estromais e glandulares sofrem regressão com a ação da finasterida e toxina botulínica do tipo A (LAROQUE et al., 1994 e 1995; SHIBATA et al., 2001; CHUANG et al., 2006a; LIN et al., 2007).

Em estudo prévio (MOSTACHIO, 2008) verificou-se que após um mês da aplicação intraprostática de 500 U de DYSPORT® em cães ocorreu uma diminuição significativa de 24,3% no tamanho do órgão. No presente estudo, a avaliação da resposta após quatro semanas da administração da mesma dose mostrou resultado levemente superior, atingindo 26,3% de regressão. Esses dados ainda estão de acordo com os relatados por LIN et al. (2007) que notaram uma diminuição significativa de 24% no volume da glândula durante o mesmo período. Assim como observado anteriormente em 2008, notou-se que as reduções após oito e 16 semanas do tratamento foram mais expressivas, atingindo valores de 31,7 e 31%, respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por SILVA et al. (2008), os quais conduzindo estudo em humanos relataram uma regressão média de 32% do volume após três meses da aplicação de 200 U de BOTOX®. Tais dados ainda sugerem que a relação de equivalência entre as concentrações de BOTOX® e DYSPORT® proposta por ROSALES et al. (2006) e utilizada neste experimento foi extremamente confiável, uma vez que experimentos realizados com diferentes marcas de toxina botulínica apresentaram resultados semelhantes.

Com relação a associação da toxina botulínica A com a finasterida, o presente estudo é o primeiro a avaliar os seus efeitos, e os resultados sugerem que a associação medicamentosa entre a TB-A e um inibidor da enzima 5 α -redutase são benéficos e promissores. Nos animais onde a associação foi utilizada (GIV), observou-se uma queda significativa na média do volume quando comparado aos valores basais. Após a

oitava semana do período experimental esta redução representou aproximadamente 56%. Curiosamente metade desse decréscimo já pode ser observado na quarta semana, indicando o rápido efeito dos fármacos.

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

No que diz respeito à comparação entre os tratamentos realizados neste experimento, a associação neurotoxina e finasterida utilizada nos animais do grupo IV evidenciou resultados superiores aos demais tratamentos, sendo este o tratamento mais indicado dentre os três apresentados. Tal discrepância pode estar relacionada ao fato de que TB-A associada a finasterida promova uma maior apoptose, uma vez que ambos fármacos possuem essa característica (LAROQUE et al. 1994 e 1995; DOGGWEILER et al., 1998; SHIBATA et al., 2001; SIRINARUMITR et al., 2001; CHUANG et al., 2005 e 2006a,b; LIN et al., 2007).

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

programada, a qual estaria relacionada a uma ação indireta da toxina (denervação) sobre a próstata. Tal fato, pode ser confirmado neste trabalho que evidenciou aumento de cinco, seis e oito vezes no índice de apoptose nos grupos II, III e IV, respectivamente.

Segundo PENNEFATHER et al. (2000) a atividade neuronal está envolvida no crescimento prostático, assim como em suas funções. A desregulação desta atividade poderia alterar a morfologia e o comportamento da próstata. Estes eventos patológicos são causados por uma mudança significativa nos neurotransmissores (acetilcolina) e fatores de crescimento, podendo desta maneira resultar no desenvolvimento do parênquima da glândula, originando a HPB. Portanto, a normalização ou uma correção favorável desta alteração neuronal seria capaz de reverter significativamente o processo patológico e melhorar os sintomas relacionados à HPB. Desta maneira, é admissível que uma parte dos resultados obtidos com a toxina botulínica seja pela regulação que a mesma promove na atividade neuronal, causando uma inibição da liberação de acetilcolina junto à terminação nervosa pré-sináptica, diminuindo a proliferação celular (CHUANG et al., 2005). Por esta razão, a toxina botulínica do tipo A seria uma opção atrativa para o tratamento da HPB.

Assim, mais estudos sobre os efeitos da toxina botulínica isoladamente ou associada a finasterida ou outros fármacos são necessários para um entendimento mais completo e preciso dos efeitos desta droga e associações sobre a próstata. Estas informações são extremamente importantes no momento da escolha das diferentes formas de tratamento da HPB.

6. CONCLUSÕES

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

- ✓ A redução ou remissão da sintomatologia clínica presente em cães com HPB ocorre em média após duas semanas da utilização da finasterida e/ou toxina botulínica A.
- ✓ O método de aplicação da neurotoxina é seguro e de baixa complexidade, não apresentando nenhuma complicação local ou sistêmica.
- ✓ A injeção de solução fisiológica 0,9% não acarreta alterações sobre a próstata de animais com hiperplasia.
- ✓ O tratamento com 5 mg de finasterida por 16 semanas promoveu reduções significativas no diâmetro e volume prostático.
- ✓ A administração de 500 U de toxina botulínica ocasionou reduções significativas no parênquima prostático de animais com HPB durante o período experimental.
- ✓ A associação da finasterida com a toxina botulínica A apresenta melhores resultado quando comparado com os resultados dos fármacos separadamente.
- ✓ Os fármacos utilizados induzem atrofia dos compartimentos glandular e estromal.
- ✓ A atrofia prostática causada pela finasterida e toxina botulínica do tipo A isoladamente ou associada a finasterida é causada por apoptose e não necrose tecidual.

CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPROSTÁTICA DE TOXINA BOTULÍNICA DO TIPO A SOBRE O TAMANHO DA PRÓSTATA E FERTILIDADE EM RATOS SPRAGUE-DAWLEY.

RESUMO - A hiperplasia prostática benigna (HPB) é condição comum, espontânea e progressiva de aumento do parênquima relacionado com o envelhecimento em cães. A patogênese da HPB não está completamente elucidada, entretanto, a diidrotestosterona (DHT) é o hormônio chave envolvido no aumento prostático. Recentemente, o efeito da toxina botulínica A foi investigado na próstata de ratos e homens e esta induziu atrofia do parênquima prostático. Este estudo tem o objetivo de investigar os efeitos da toxina botulínica A na próstata de ratos e sobre a sua fertilidade. Vinte e quatro ratos machos adultos, não castrados foram utilizados e divididos aleatoriamente em dois grupos. Cada lobo prostático recebeu a administração de 0,1 mL de solução fisiológica 0,9% (Grupo I) ou 12,5 U (0,1 mL) de toxina botulínica A (Grupo II). Os resultados clínicos foram obtidos uma ou duas semanas após o tratamento. Nenhuma complicação local, efeitos adversos ou problemas de fertilidade foram notados após os tratamentos. A administração de solução fisiológica não acarretou mudanças significativas no volume prostático após uma ou duas semanas do início do tratamento. Por outro lado, a administração de 25 U de TB-A reduziu significativamente o volume da glândula em 30 e 17,9% após uma ou duas semanas, respectivamente. Resultados sugerem que a administração de 25 U de TB-A contribui para a redução do peso da próstata induzida por apoptose e não por necrose e ainda não interfere na fertilidade dos ratos.

Palavras-chave: Fertilidade, Hiperplasia Prostática Benigna, Próstata, Ratos, Toxina Botulínica A.

CHAPTER 3 - EFFECTS OF THE INTRAPROSTATIC ADMINISTRATION OF BOTULINUM TOXIN TYPE A ON SIZE OF THE PROSTATE GLAND AND FERTILITY OF SPRAGUE-DAWLEY RATS.

SUMMARY - Benign prostatic hyperplasia (BPH) is a common, naturally developing, age-related condition in dogs. The pathogenesis of BPH is not completely known; however, DHT is a hormone involved in enlargement of the prostate. Recently, the effect of botulinum toxin A (BT-A) was investigated in the rat and human prostate and has shown to induce atrophy of the glands. This study investigated the effect of BT-A in the rat prostate and on the fertility. Twenty four sexually intact male rats were randomly assigned in two groups. Each lobe of the prostate received injection of 0,1 mL of saline solution (Group I) or 12,5 U of BT-A (Group II). The clinical results were evaluated at one and two weeks after treatment. No local complications, systemic adverse effects or fertility problems were reported. At 1 and 2 weeks, the mean prostate volume (PV) was not significantly changed after intraprostatic administration of saline solution. On the other hand, 25 U of BT-A administration has show to significantly reduce the volume prostate in 30% and 17,9% after one or two weeks, respectively. Results suggest that the administration of 25 U of BT-A contribute to prostate volume reduction by apoptosis rather than necrosis and do not adversely affect the fertility of rats.

Keywords: Botulinum Toxin A, Benign Prostatic Hyperplasia, Fertility, Prostate, Rats.

1. INTRODUÇÃO

A toxina botulínica do tipo A é uma poderosa neurotoxina biológica. Apesar da sua alta toxicidade, sua forma purificada pode ser utilizada como medicação para o tratamento de inúmeras desordens, como estrabismo, blefaroespasma, distonia cervical, espasticidade focal, hiperhidrose, dissinergia do detrusor do esfíncter, paralisia cerebral juvenil, fissura anal, acalasia, analgesia, entre outras (MARIA et al., 2003; REITZ et al., 2004; DRESSLER et al., 2005). Recentemente, esta se mostra segura e com alta efetividade no tratamento da hiperplasia prostática benigna humana (MARIA et al., 2003; CHUANG et al., 2005; KUO, 2005; RUSNACK & KAPLAN, 2005; ANTUNES et al., 2007).

Inúmeros trabalhos indicam a efetividade da toxina botulínica do tipo A com finalidade urológica (MARIA et al., 1998; SCHURCH et al., 2000; PHELAN et al., 2001; KUO, 2003; HARPER et al. 2004; KUO, 2004; REITZ et al., 2004; SCHURCH & REITZ, 2004; KARSENTY et al. 2006; THOMAS et al. 2006; KUO, 2007). O uso da neurotoxina botulínica para o tratamento da hiperplasia prostática benigna se iniciou em virtude da função prostática ser significativamente influenciada pela inervação autônoma. O componente estático, ou seja, o tecido epitelial prostático (compartimento glandular) está sob controle parassimpático e regulado por andrógenos, enquanto o componente dinâmico, o compartimento estromal, é influenciado simpaticamente. Tais dados evidenciam que a inervação parassimpática colinérgica da próstata é importante na função secretória acinar da glândula e no seu crescimento, enquanto a inervação simpática noradrenérgica está implicada na contração da musculatura lisa do órgão (LEPOR & KUJAR, 1984; HIGGINS & GOSLING, 1989; PENNEFATHER et al., 2000; VENTURA et al., 2002). Em adição, estudos relataram que receptores adrenérgicos e muscarínicos estão presentes nas células epiteliais e no estroma fibromuscular da próstata humana, estimulando os fatores de crescimento epidermal, transformação e proliferação celular (VAALASTI & HERVONEN, 1980; HEDLUND et al., 1985; COCKETT et al., 1993; RUGGIERI et al., 1995; RAVINDRANATH et al., 2001). BLOCH

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

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

Estes achados foram confirmados subsequentemente na próstata de cães e homens. A injeção de 200 U de TB-A em homens reduziu o volume prostático e urinário residual, além de melhorar a qualidade de vida dos pacientes (MARIA et al., 2003; KUO, 2005). Outro estudo, no qual 100 U da neurotoxina foram administradas na próstata de cães, reportaram significativa apoptose celular 1 e 3 meses após o tratamento, embora o volume médio prostático não ter apresentado redução (CHUANG et al., 2006a).

Apesar da existência de algumas diferenças entre a hiperplasia prostática benigna humana, canina e em ratos, essas duas espécies animais podem ser utilizadas com o intuito de averiguar a eficácia de fármacos que promovem a redução do órgão. Ao nosso conhecimento, nenhum estudo investigou os efeitos do DYSPORT® (toxina botulínica A) sobre a fertilidade e peso (volume) da próstata de ratos.

2. OBJETIVOS

Avaliar a influência da toxina botulínica do tipo A sobre o peso (volume) prostático e fertilidade de ratos sprague-dawley.

Investigar o efeito da toxina botulínica A sobre a estrutura e composição do epitélio e estroma prostático.

Analisar e quantificar os índices de apoptose ocorrido após o tratamento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados 24 machos adultos, não orquiectomizados da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem sprague-dawley, pesando $387,0 \pm 35,1$ g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas e mantidos com ração comercial e água fornecidos em regime *ad libitum*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais contendo 12 animais cada. No grupo 1 (controle), os animais foram submetidos a administração de 0,1 mL de solução fisiológica 0,9% em cada lobo prostático, totalizando 0,2 mL. No grupo 2, o animais receberam 25 unidades (U) cada de toxina botulínica do tipo A, dividida em duas aplicações de igual volume (12,5 U ou 0,1 mL).

3.2. Procedimento Anestésico

Os ratos de todos os grupos experimentais foram pré-medicados com meperidina¹ (5mg/kg) pela via subcutânea. Após 10 minutos, a anestesia foi induzida com tiletamina-zolazepam² na dose de 30 mg/Kg de peso corpóreo pela via intraperitoneal.

3.3. Toxina Botulínica do Tipo A

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

¹ Dolosal[®] - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda - Itapira - São Paulo - Brasil

² Zoletil 50[®] - Virbac – São Paulo – Brasil

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

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

Em virtude da maior parte das pesquisas urológicas em ratos serem realizadas utilizando a medicação BOTOX® e a dose de 10 ou 20 U, e neste experimento utilizar-se a medicação DYSPORT®, realizou-se a equivalência dos produtos empregando a taxa de conversão de 1 unidade de BOTOX® para cada 2,5 unidades de DYSPORT® (ROSALES et al., 2006), promovendo desta maneira o uso das mesmas doses preconizadas pelos trabalhos científicos avaliados, entretanto, utilizando dose de 25 unidades da toxina botulínica do tipo A.

Reconstituindo 500 U de toxina botulínica A em 4,0 mL de solução fisiológica obteve-se a concentração de 12,5 U de toxina botulínica A para cada 0,1 mL de solução ressuspendida.

3.3.1. Técnica de Aplicação

A administração de solução fisiológica 0,9% e de toxina botulínica A foi realizada em todos os animais do GI e GII, respectivamente, perfazendo doze animais. Após anestesia, tricotomia da região abdominal e antissepsia, os animais foram acomodados em decúbito dorsal. Via laparotomia convencional, a glândula prostática foi identificada. Ato contínuo, introduziu-se agulha de calibre (13x4,5 mm) adequado ao porte do animal no interior da próstata, e cada lobo dos animais do GI receberam ou 0,1 mL de solução fisiológica 0,9%. Tal procedimento realizou-se também em cada animal do GII, no entanto, cada lobo prostático destes animais receberam 12,5 U ou 0,1 mL de toxina botulínica A, totalizando 25 U. Após a administração do fármaco, a musculatura

abdominal e pele foram suturadas individualmente com pontos simples separados utilizando fio de sutura nylon agulhado 4-0 ou 5-0.

3.4. Mensuração do Peso Prostático (Volume)

Para cada grupo experimental, três animais foram anestesiados e eutanasiados após uma ou duas semanas. Através de laparotomia, a glândula prostática dos animais foi localizada, retirada e pesada. Para tal foi utilizada balança analítica¹ com capacidade de 200 g e precisão de 0,0001 g. Para facilitar a análise dos resultados, os dados obtidos foram expressos em gramas para cada 100 g de peso corpóreo.

3.5. Avaliação Anatomopatológica

Para cada grupo experimental, três animais foram anestesiados e eutanasiados após uma semana. Pela laparotomia, a glândula prostática foi retirada e armazenada.

3.5.1. Avaliação Histológica

Para análise histológica, o material foi transferido para o álcool 70%, até a retirada do excesso de fixador (formol 10%). Após a retirada do fixador, as biópsias foram desidratadas em série crescente de etanol (70–100%), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina plástica. As secções histológicas foram obtidas em micrótomo automático, obtendo-se cortes de 5µm em sequência semi-seriada (1corte/100µm desprezados). Os cortes foram corados em hematoxilina-eosina segundo a metodologia de Behmer et al. (1976). O processamento histológico foi realizado no setor de Técnicas Morfológicas do Laboratório de Histologia da FCAV/UNESP.

¹ Shimadzu AX 200® - Shimadzu do Brasil - São Paulo - Brasil

3.5.2. Avaliação *in situ* da apoptose via TUNEL

Para avaliar a apoptose em células prostáticas foi realizado o método do TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling). O princípio desse método se baseia na clivagem do DNA genômico durante a apoptose, quebrando-o em dois segmentos, um com alto e outro com baixo peso molecular do DNA (mono e oligonucleossomos respectivamente). Esses fragmentos livres podem ser identificados por marcador livre 3'-OH terminal com nucleotídeos modificados através de uma reação enzimática. A reação do TUNEL preferencialmente marca segmentos de DNA clivados durante a apoptose. Esse procedimento permite discriminar a apoptose da necrose e das clivagens primárias de DNA induzidas por drogas citostáticas ou por irradiação. O TUNEL pode sofrer interferências, apresentando resultados falso-negativos ou falso-positivos. Os falso-negativos ocorrem, pois o DNA clivado pode ser isento ou incompleto em algumas formas de apoptose. Isso acontece, pois certos componentes da matriz extracelular podem prevenir o acesso do TdT aos segmentos de DNA. Os falso-positivos acontecem, pois a fragmentação extensiva do DNA pode advir em estados tardios de necrose.

As fitas de DNA também podem ser proeminentes em populações de células com alto grau de proliferação ou atividade metabólica. Nesses casos, é possível obter um resultado falso-positivo. Para confirmar o processo apoptótico de morte celular, a morfologia dessas respectivas células deve ser examinada com muito cuidado. As mudanças morfológicas durante a apoptose tem uma característica padrão, tornando a avaliação da morfologia celular um parâmetro importante nas situações em que algumas ambiguidades na interpretação dos resultados.

O ensaio de TUNEL foi realizado utilizando o kit "In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein"¹. Cortes histológicos colados em lâminas revestidas por organosilano obtidos após uma e duas semanas de tratamento, foram desparafinizados, hidratados e permeabilizados em solução de Proteinase K 20 µg/mL diluído em tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,4 e incubadas por 10 minutos a 37°C em câmara úmida. As lâminas

¹ Roche Applied Science – Alemanha.

empregadas como controle foram incubadas com Dnase I (10 U/ μ L) diluída em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5 por 30 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida. Em seguida, ao abrigo da luz, os cortes foram incubados com solução de TUNEL (enzima TdT-Terminal deoxynucleotidyl Transferase) na diluição 1:10 entre os reagentes A (Enzyme Solution) e B (Label Solution) do kit, seguindo-se a orientação do fabricante por 1:30 horas 37°C em câmara úmida. A lâmina do controle negativo foi incubada somente com o reagente B, omitindo-se o reagente A.

Posteriormente, os cortes foram lavados 3 vezes em tampão PBS pH 7,3 por 10 minutos. As lâminas foram secas e montadas em Prolong antifade. A visualização foi realizada em microscópio de fluorescência com filtro para fluoresceína em aumento de 40 vezes. Foram avaliados 500 núcleos (células) por lâmina para expressar o índice de apoptose, sendo o número de células apoptóticas expresso em relação ao número total de células contadas.

3.6. Mensuração da Fertilidade

Para cada grupo experimental, três machos sabidamente férteis foram alocados individualmente com fêmeas férteis por um período mínimo de dois meses e uma gestação avaliada. A ocorrência de teratogenicidade, peso e tamanho da ninhada foram verificados.

3.7. Análise Estatística

No experimento foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, composto por 2 tratamentos e 12 animais por tratamento, totalizando 24 animais. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *t* de Student pareado, empregado para comparação de médias entre os diferentes tempos dentro do mesmo grupo.

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

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

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

4. RESULTADOS

Nenhum dos animais sofreram complicações, como infecção ou deiscência dos pontos, após os procedimentos da aplicação intraprostática de solução fisiológica ou toxina botulínica. No entanto, uma ligeira perda de peso corporal (5 a 10%) foi observada em ambos os grupos. Entretanto, como essa perda foi similar no grupo controle e tratamento, a perda de peso foi considerada secundária ao estresse cirúrgico e não a toxicidade da toxina botulínica A.

O protocolo anestésico utilizado foi adequado e propiciou bom relaxamento muscular e tempo cirúrgico. A indução dos animais foi suave e a duração média da anestesia foi de $35 \pm 5,3$ minutos.

4.1. Mensuração do Peso Prostático (Volume)

A administração de solução fisiológica não promoveu alteração no peso do órgão. A média do peso prostático de 6 animais normais foi de 0,166 g para cada 100 g de peso corpóreo. Uma distribuição similar foi encontrada no peso da glândula dos animais que receberam solução fisiológica 0,9% ($0,162 \pm 0,007$ g). Entretanto, a injeção de toxina botulínica A provocou mudança significativa no peso (volume) prostático. Uma semana após a administração do fármaco, a média do peso foi de $0,115 \pm 0,011$ g, causando uma regressão significativa de 29,0%. Após duas semanas da aplicação da neurotoxina os efeitos foram menos significantes. Comparando os dados obtidos com os dos animais que receberam solução fisiológica, o percentual de redução alcançado foi de 17,9%.

As médias e desvios padrão dos pesos prostáticos dos animais estudados após ministrar solução fisiológica 0,9% ou toxina botulínica do tipo A, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios $\pm$ desvios padrão dos pesos prostáticos dos animais que receberam a administração intraprostática de solução fisiológica 0,9% (Grupo I) e de toxina botulínica do tipo A (Grupo II), no período de uma e duas semanas. Jaboticabal – SP, 2012.

Semanas	Grupo I	Grupo II
1	0,162 $\pm$ 0,007 ^{aA}	0,115 $\pm$ 0,011 ^{bA}
2	0,163 $\pm$ 0,009 ^{aA}	0,133 $\pm$ 0,005 ^{bB}

a, b – Médias na mesma linha com uma letra minúscula em comum não diferem significativamente entre si pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

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

4.2. Avaliação Histológica

A altura das células epiteliais diminuiu em todos os animais que receberam toxina botulínica A, e os núcleos das células basais apresentavam cromatina condensada. O componente glandular apresentou atrofia generalizada, mostrando luz reduzida e uma regressão menos evidente do estroma após a administração da neurotoxina. Em relação aos animais que receberam a administração de solução fisiológica não houve alterações na histologia celular.

4.3. Avaliação *in situ* da apoptose via TUNEL

A avaliação da apoptose via TUNEL evidenciou pequeno grau de morte celular nas secções teciduais dos animais do grupo controle. O tratamento com 25 U de toxina botulínica A promoveu aumento significativo no índice de apoptose das células. Após uma semana do tratamento, a média de apoptose foi de $57,4 \pm 4,5$ células. Comparando esses dados com os obtidos no grupo controle, a administração da toxina promoveu um aumento aproximado de 12 vezes na taxa de apoptose. Entretanto, após

duas semanas do tratamento, a taxa de apoptose regrediu e ficou em torno de duas vezes maior do que no grupo controle. (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvios padrão de células apoptóticas dos animais que receberam a administração intraprostática de solução fisiológica 0,9% (Grupo I) e de toxina botulínica do tipo A (Grupo II), após uma e duas semanas. Jaboticabal – SP, 2012.

Semanas	Grupo I	Grupo II
1	4,6 $\pm$ 1,2 ^{aA}	57,4 $\pm$ 4,5 ^{bA}
2	4,9 $\pm$ 0,9 ^{aA}	8,9 $\pm$ 0,8 ^{bB}

a, b – Médias na mesma linha com uma letra minúscula em comum não diferem significativamente entre si pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

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

4.4. Mensuração da Fertilidade

A administração intraprostática de solução fisiológica ou toxina botulínica do tipo A não acarretou alterações significativas no número, peso ou viabilidade dos neonatos.

A média e desvio padrão do número de fetos nascidos para o grupo I antes e após a administração de solução fisiológica foi de 7,3 $\pm$ 0,6 e 8,3 $\pm$ 1,2 filhotes, respectivamente (Figura 1).

No que se refere a administração de toxina botulínica nos animais do grupo II, a média e desvio padrão do número de filhotes nascidos antes e após o tratamento foi de 7,7 $\pm$ 0,6 e 6,7 $\pm$ 0,6 filhotes, respectivamente (Figura 1).

Alterações teratogênicas, como malformação óssea ou de partes moles, não foram observadas nos neonatos nascidos de ambos grupos experimentais.

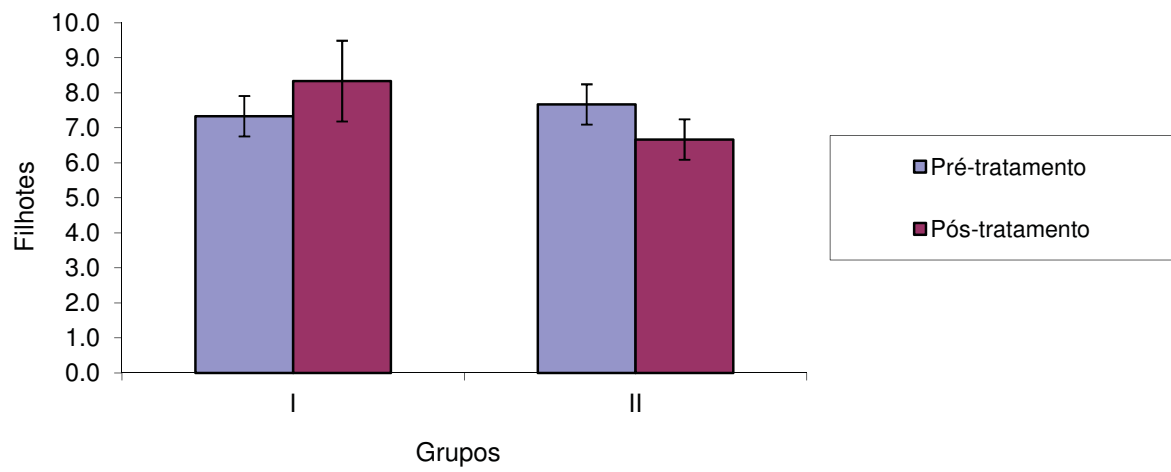


Figura 1. Representação gráfica dos valores médios $\pm$ desvios padrão do número de filhotes nascidos no grupo I e II antes e após a administração de solução fisiológica ou toxina botulínica A intraprostaticamente.

5. DISCUSSÃO

Cães e ratos são comumente utilizados como modelos experimentais para o estudo da hiperplasia prostática benigna humana e esses estudos revelam importantes aspectos da enfermidade e novas terapias que apresentam segurança e baixos efeitos colaterais, como a toxina botulínica A. Entretanto, até agora, nenhum estudo in vivo utilizando esse fármaco assegurou os efeitos dessa nova modalidade terapêutica sobre a fertilidade dos animais envolvidos.

A administração de solução fisiológica 0,9% não acarretou alterações na composição histológica da glândula, no índice de apoptose, no volume prostático e fertilidade dos animais utilizados. Esses dados estão de acordo com os descritos na literatura (DOGGWEILER et al., 1998; CHUANG et al., 2006b).

Os resultados mostram que os efeitos de atrofia glandular da toxina botulínica A são semelhantes nos três lobos que compõem a próstata, entretanto diferenças de intensidade existem mas não atingem valores significativos. Estas variações lobares podem significar diferenças nos efeitos da toxina botulínica entre as diferentes zonas da próstata humana, visto que o lobo dorsolateral é considerado homólogo a zona periférica e o lobo anterior a zona central (ROY-BURMAN et al., 2004).

A próstata humana é rica em musculatura lisa, fibrócitos e fibras de tecido conjuntivo, enquanto a próstata de ratos é principalmente glandular (DOGGWEILER et al., 1998). No presente estudo, o componente glandular foi profundamente afetado pela administração de DYSPORT®, enquanto a atrofia do compartimento estromal foi menos pronunciada. Esses achados estão de acordo com DOGGWEILER et al. (1998) e CHUANG et al. (2006b), que descrevem que tais alterações são compatíveis com a inervação e arquitetura tecidual do órgão.

ROHRBACH et al. (2001) descreveram que os efeitos da TB-A depende do local da administração, da dose e intervalo de aplicação utilizado e que o processo de remissão dos efeitos requer aproximadamente de dois a seis meses em junções neuromusculares de mamíferos. Em nosso estudo, os efeitos da toxina botulínica foram

mais evidentes após uma semana da aplicação, com decréscimo dos seus efeitos na segunda semana de avaliação. Tais observações também foram relatadas por CHUANG et al. (2006b) e estes especulam que o tecido prostático de ratos podem ter uma maior taxa de proliferação e apoptose do que o tecido de mamíferos e assim os resultados podem não ser tão fidedignos em humanos.

Os índices de apoptose observados neste experimento não foram os mesmo atingidos por CHUANG et al. (2006b), o qual conseguiu um aumento de 16 vezes na taxa de apoptose após uma semana de tratamento. Em nosso estudo, o aumento observado foi de 12 vezes quando comparado com os animais pertencentes ao grupo controle. Entretanto, a queda na taxa de apoptose observada por CHUANG et al. (2006b) após duas semanas da aplicação da toxina também foi verificada por nós, entretanto, nossos dados foram ligeiramente superiores ao apresentados na literatura (DOGGWEILER et al., 1998; CHUANG et al. 2006b). Uma possível explicação para esta variedade de resultados seria a utilização de diferentes marcas de toxina botulínica e dose, mesmo que ROSALES et al. (2006) tenham descrito as doses de equivalência entre os fármacos DYSPORT® e BOTOX®.

CHUANG et al. (2006b) estudando a funcionalidade do BOTOX® na próstata de ratos evidenciou generalizada atrofia prostática, com aumento significativo na taxa de apoptose celular e redução na proliferação das células após uma semana da aplicação. Observaram ainda uma redução dose dependente no volume da próstata, sendo que a administração de 5 U promoveu uma diminuição de 24,7%, enquanto a aplicação de 10 e 20 U acarretou um decréscimo de 30,7 e 54,8%, respectivamente. No presente estudo, a avaliação da resposta à administração de 25 U de DYSPORT® (equivalente a 10 U de BOTOX®) após uma semana mostrou decréscimo ligeiramente inferior ao relatado por CHUANG et al. (2006b). Neste período observamos que o volume prostático regrediu em 29%. Por outro lado, notamos uma maior depleção após duas semanas, atingindo esta valor de 17,9% contra 16,7% obtido por CHUANG et al. (2006b).

Três diferentes tipos de fibras cursam no tecido prostático: as aferentes primárias e as fibras simpáticas e parassimpáticas. A inervação parassimpática está localizada

preferencialmente no compartimento glandular da próstata, onde a aplicação de toxina botulínica causa uma significativa apoptose (DOGGWEILER et al., 1998; CHUANG et al., 2006b). A acetilcolina liberada por estas fibras regula a secreção do órgão após atingir seus sítios de ligação (receptores muscarínicos) (RUGGIERI et al., 1995; WITTE et al., 2008). Por conseguinte, é provável que parte da redução observada após a administração da toxina botulínica seja devido a um decréscimo da secreção mediada pela acetilcolina e diminuição no número de células glandulares.

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

A próstata é um órgão andrógeno dependente, requerendo uma fonte de testosterona para o seu crescimento e função. O tratamento convencional com inibidor da enzima 5 α -redutase (finasterida) diminui os níveis de testosterona e DHT, no entanto, esse não é efetivo em todos os pacientes e apresenta efeitos colaterais em humanos como impotência e diminuição da libido. Portanto, fármacos como a toxina botulínica que apresentam efeitos locais e diminuem o volume prostático sem alterar a função androgênica são altamente desejados. Nosso estudo demonstra que a aplicação de toxina botulínica em ratos sprague-dawley não afeta a fertilidade in vivo e não acarreta alterações teratogênicas nos filhotes nascidos e tais resultados podem estar relacionados a inocuidade da toxina botulínica nos parâmetros e morfologia espermática como observado por MOSTACHIO (2008) e MOTHEO (2009).

Estudo prévio em cães (MOSTACHIO, 2008) demonstrou que a administração intraprostática de TB-A não promoveu alterações significativas nas características (volume, motilidade, vigor, concentração por mL, concentração total e pH) e morfologia espermática. Dando continuidade a esse experimento, MOTHEO (2009) avaliou o sêmen e o plasma seminal de cães após a administração de TB-A. Com base nos

resultados obtidos concluiu que a membrana plasmática dos espermatozoides manteve-se preservada após a administração da toxina e que a aplicação do fármaco não resultou em mudanças significativas nos parâmetros e morfologia espermática. Demonstrou-se ainda, que o perfil bioquímico e eletroforético das proteínas do plasma seminal mantiveram-se inalterados. Assim, a toxina botulínica não acarreta alterações seminais e consequentemente não interfere na fertilidade dos animais como foi demonstrado no presente estudo.

Os resultados do presente estudo concordam com os apresentados por SPOSITO (2004), que avaliando a influência da neurotoxina sobre a fertilidade de ratos descreveu que esta somente ocasionou ligeiro decréscimo desta quando elevadas doses foram fornecidas a estes animais. Segundo o mesmo autor, altas concentrações ministradas a fêmeas provocaram alterações no ciclo estrogênico, entretanto, esta desregulação não originou mudanças no número e na viabilidade dos embriões.

Em função dos tratamentos convencionais com inibidores da enzima 5 α -redutase, antiandrógenos e outros serem apresentados como uma alternativa a orquiectomia em animais reprodutores que apresentam hiperplasia, os mesmos ostentam efeitos colaterais indesejáveis quanto ao sistema reprodutivo, e assim a toxina botulínica apresenta-se como uma ótima alternativa devido seus efeitos sobre a fertilidade in vitro e in vivo. No entanto, por causa do pequeno número de animais estudados que receberam a administração de toxina botulínica A, novos estudos devem ser realizados para assegurar a completa ausência de efeitos do medicamento sobre a fertilidade. Com esses resultados a mão, sua aplicação prática será útil, tanto nos cães domésticos, como nos seres humanos.

6. CONCLUSÕES

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

- ✓ O método de aplicação da neurotoxina é seguro e de baixa complexidade, não apresentando nenhuma complicação local ou sistêmica.
- ✓ A injeção de solução fisiológica 0,9% não acarreta alterações sobre a próstata e fertilidade de ratos sprague-dawley.
- ✓ A administração de 25 U de toxina botulínica (DYSPORT®) ocasionou reduções significativas no parênquima prostático de ratos sprague-dawley durante o período experimental.
- ✓ A toxina botulínica induzem atrofia do compartimento estromal e glandular, sendo mais evidente neste último.
- ✓ A atrofia prostática causada pela toxina botulínica do tipo A é causada por apoptose e não necrose tecidual.
- ✓ A administração da neurotoxina não acarreta alterações teratogênicas e sobre a fertilidade de ratos sprague-dawley.

REFERÊNCIAS¹

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

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

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

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

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

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

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

¹ABNT-NR 6023

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

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

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

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

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

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

BHEMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART USP, 1976. 241p.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

JOHNSTON, G. R. et al. Diagnostic imaging of the male canine reproductive organs. Methods and limitations. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, n. 3, p. 553–589, 1991.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LAROQUE, P. A. et al. Quantitative evaluation of glandular and stromal compartments in hyperplastic dog prostates: effect of 5-alpha reductase inhibitors. **The Prostate**, v. 27, n. 3, p. 121-128, 1995.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MOSTACHIO, G. Q. **Estudo comparativo entre a administração de toxina botulínica "A" e a orquiectomia no tratamento da hiperplasia prostática benigna do cão.** 2008. 87f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

MOTHEO, T. F. **Avaliação dos parâmetros espermáticos e caracterização do perfil bioquímico do plasma seminal de cães (*Canis familiars* - LINNAEUS, 1758) com hiperplasia prostática benigna, tratados com toxina botulínica A.** 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ROHRBACH, S. et al. Botulinum toxin type A induces apoptosis in nasal glands of guinea pigs. **The Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology**, v. 110, n. 11, p. 1045-1050, 2001.

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

ROY-BURMAN, P. et al. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. **Endocrine-related Cancer**, v. 11, n. 2, p. 225-254, 2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WITTE, L. P. W. et al. Cholinergic innervation and muscarinic receptors in the human prostate. **European Urology**, v. 54, n. 2, p. 326-334, 2008.

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

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