

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE APC, E-CADERINA, β -
CATENINA E CAVEOLINA-1 NO PROCESSO CARCINOGENÉTICO
DA PRÓSTATA CANINA E SUAS METÁSTASES**

PRISCILA EMIKO KOBAYASHI

BOTUCATU_SP
FEVEREIRO-2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE APC, E-CADERINA, β -
CATENINA E CAVEOLINA-1 NO PROCESSO CARCINOGENÉTICO
DA PRÓSTATA CANINA E SUAS METÁSTASES**

PRISCILA EMIKO KOBAYASHI

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

Orientador(a): Prof.Dr. Renée Laufer Amorim

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Kobayashi, Priscila Emiko.

Expressão gênica e proteica de APC, E-caderina, β -catenina e Caveolina-1 no processo carcinogênico da próstata canina e suas metástases / Priscila Emiko Kobayashi. - Botucatu, 2016

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

Orientador: Renée Laufer Amorim

Capes: 50503006

1. Expressão gênica. 2. Próstata - Câncer. 3. Células - Adesão. 4. Carcinógenos.

Palavras-chave: Adesão celular; Cão; Metástase; Via WNT.

Nome do Autor: Priscila Emiko Kobayashi

Título: **Expressão gênica e proteica de APC, E-caderina, β -catenina e Caveolina-1 no processo carcinogênico da próstata canina e suas metástases.**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^aDr^a Renée Laufer Amorim
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr. Sandra Aparecida Drigo Linde
Membro
Departamento de Urologia
FM– UNESP – Botucatu

Prof.Dr. Sebastião Roberto Taboga
Membro
Departamento de Biologia
IBILCE- UNESP- São José do Rio Preto

Data da Defesa: 22 de fevereiro de 2016.

Agradecimentos

Primeiramente à Deus e minha família, pilares que me fortalecem todos os dias, e sem esse apoio não chegaria tão longe. Obrigada pelos ensinamentos de vida, muito mais importante do que qualquer teoria aprendida durante anos de estudo na faculdade. Agradeço a paciência, respeito e todo o esforço dos meus pais durante toda trajetória. Obrigada pelo amor único e incondicional, minha gratidão será eterna.

À Professora Renée Laufer Amorim, não somente pela orientação durante o trabalho, mas pelo envolvimento e comprometimento com cada orientado de uma forma humanista. Obrigada por considerar nosso lado pessoal e ser essa pessoa tão amorosa durante toda nossa jornada.

Aos professores Julio e Noeme que também participaram da minha formação acadêmica nesta área da Patologia, e junto com a professora Renée, me mostraram o início e a beleza desse longo caminho.

À Carlos Alexei Pereira de Carvalho pelo companheirismo e injeção de ânimo nos momentos que mais precisei. Obrigada por estar disposto para caminharmos na mesma direção, acrescentar novas visões ao meu mundo, o qual faz parte. Além de tudo, obrigada por dividir as experiências para crescermos juntos como casal.

Ao mais que colega de trabalho, Carlos Eduardo Fonseca Alves, pelo apoio em todos os momentos, por me tranquilizar nos momentos desesperadores, mostrando que é sempre possível quando se faz com vontade e amor ao trabalho. Com certeza, essa inspiração que transmite às pessoas nos torna pessoas melhores no mundo acadêmico ou fora dele.

À Marcela Marcondes Pinto Rodrigues pelas palavras de sabedoria nos meus momentos introspectivos, mas acima de tudo pela alegria que tanto me identifico e pela boa energia que traz consigo. Obrigada “miguxa”!

À Sarah, Clau e Dani, amigas que a Universidade me apresentou e mesmo com a distância compartilhamos ótimo momentos de descontração e risadas.

À Juliano, Isamery, Diogo, Rafael, Claudia, Luga, Thalita, Mauricio, Haline, Tália e a nova integrante Jaque pelas risadas e ótima convivência, pois

sem esse ambiente agradável, o trabalho seria muito mais difícil durante os dias.

Aos residentes Caio, Maira e Fabrício que além de dividirem o ambiente de trabalho, ajudaram nas coletas, compartilharam conhecimento, dividiram casos clínicos para discussões proveitosas.

À Sra. Val que é obrigada a aguentar as amolações desses jovens. Obrigada por auxiliar no processamento dos materiais, e aos conselhos e cuidados de mãe, nessa nossa segunda casa.

Ao Maury e Claudinei, que ajudam e muito nas necropsias, animam a sala de trabalho com música diária e boas piadas.

Aos amigos verdadeiros que a aliança da amizade se mantém forte apesar da distância.

À todos os animais que contribuíram e que contribuirão para meu aprendizado durante todo ciclo de estudos.

Muito obrigada a todos que passaram pelo meu caminho e contribuíram direta ou indiretamente durante a evolução do meu trabalho e pessoal. Obrigada!

Lista de figuras

Figura 1-	Escore de Gleason modificado-----	Pág 9
Figura 2-	Via WNT canônica ativada -----	Pág 12
Figura 3 -	Via WNT canônica desativada -----	Pág 12
Figura 4-	Metilação do gene <i>APC</i> -----	Pág 16
Figura 5-	Consequências da metilação do gene <i>APC</i> -----	Pág16

Lista de abreviações

APC	Adenomatous polyposis coli
CAV-1	Caveolina-1
CaP	Carcinoma prostático
PIA	Atrofia inflamatória proliferativa
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática
INCA	Instituto Nacional do Câncer
NCI	National Cancer Institute
AR	Receptor de Andrógeno

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	14
INTRODUÇÃO	14
REVISÃO DE LITERATURA	15
CAPÍTULO 2- TRABALHOS CIENTÍFICOS.....	28
CAPÍTULO 3	76
DISCUSSÃO GERAL.....	76
CONCLUSÕES GERAIS.....	79

KOBAYASHI,P.E. **Expressão gênica e proteica de APC, E-caderina, β -catenina e Caveolina-1 no processo carcinogênico da próstata canina e suas metástases**. Botucatu, 2016. 87p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

As alterações na expressão de E-caderina, β -catenina, APC e Caveolina-1 nas células epiteliais prostáticas têm sido estudados em humanos como mecanismos relacionados com progressão tumoral, invasão e metástase. Estas proteínas estão envolvidas no processo de adesão celular e ativação da via WNT canônica. No cão, a perda da expressão proteica de E-caderina e a translocação da β -catenina da membrana para o citoplasma/núcleo foram descritas anteriormente em lesões prostáticas caninas. No entanto, nenhum estudo correlacionou alterações de expressão dessas proteínas com as proteínas APC e Caveolina-1. Devido ao prognóstico desfavorável do carcinoma prostático (CaP) no cão e a importância da identificação de novos marcadores prognósticos e preditivos, o presente estudo visou avaliar as expressões gênica e proteica de E-caderina, β -catenina, APC e Caveolina-1 em diferentes lesões prostáticas caninas, além de avaliar o padrão de metilação do gene APC. Foram utilizados neste estudo 10 CaPs, 4 metástases de carcinoma prostático, 10 amostras de atrofia inflamatória proliferativa (PIA) e 10 próstatas normais de cães para análise imuno-histoquímica. Para a técnica de RT-qPCR foram utilizados 11 próstatas normais, 11 PIA, 17 CaPs e 3 metástases. Para análise de metilação foram utilizadas seis próstatas normais, seis próstatas com PIA e 12 CaPs. Este estudo revelou aumento de expressão gênica e proteica de Caveolina-1 nas amostras de CaP e metástases, além de menor expressão nas amostras de carcinoma com escore de Gleason mais baixos. Identificou-se marcação membranosa de E-caderina e β -catenina nas próstatas normais e perda heterogênea nas lesões estudadas. A expressão de β -catenina apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos, e somente as amostras de carcinoma prostático e metástases apresentaram marcação citoplasmática e/ou nuclear. Discreta perda na expressão proteica de

APC foi observada nos CaP, porém não houve alteração na análise de metilação da ilha CpG da região promotora do gene *APC*, sugerindo mecanismos diferentes de regulação do APC no homem e no cão. Estes resultados sugerem uma participação e interação das referidas proteínas durante a carcinogênese e metástase prostática.

Palavras-chave: via WNT, adesão celular, metástase, cão.

KOBAYASHI,P.E. **APC, E-cadherin, β -catenin and Caveolin-1 gene and protein expression in canine prostate carcinogenic and metastatic process.** Botucatu, 2016. 87p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Altered expression of E-cadherin, β -catenin, APC and Caveolin-1 in prostate epithelial cells has been studied in humans as mechanisms related with tumor progression, invasion and metastasis. These proteins are involved in cell-cell cohesion and participate in the activation of the canonical WNT pathway. In dogs, membranous E-cadherin loss and translocation of β -catenin from the membrane to cytoplasm/nucleus were described previously in canine prostatic lesions. However, studies correlating these genes have not been reported their proteins with APC and Caveolin-1 expressions in canine prostatic lesions. Due to poor prognosis in canine prostate carcinoma (PC) and the need to develop new prognostic and predictive biomarkers, this study aimed to evaluate gene and protein expression of E-cadherin, β -catenin, APC and Caveolin-1 in different canine prostatic lesions, and the methylation status of APC gene. We used 10 PC, 4 prostate metastasis, 10 proliferative inflammatory atrophy(PIA) and 10 canine normal prostates tissues for immunohistochemistry. For RT-qPCR we used 11 normal prostate, 11 PIA, 17 PC and 4 metastasis. For methylation analysis, we used six normal prostates, 6 PIA and 13 PC. This study revealed increased Caveolin-1 gene and protein expression in PC and metastasis and lower expression were found in tumors with lower Gleason score. Membranous E-cadherin and β -catenin staining was observed in normal prostate samples whereas heterogenous loss was detected in other samples. β -catenin expressions was statistical difference ($P<0,05$) between the groups, only PC and metastasis had cytoplasmic and/or nuclear pattern. Discrete loss of APC protein expression in prostate carcinomas was observed with no alteration in methylation status of APC promoter CpGs islands, suggesting men and dogs have different regulatory mechanisms of APC. These results suggest a

participation and interaction of these proteins in carcinogenesis and prostate metastasis.

Key words: WNT pathway, cell adhesion, metastasis, dog.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é uma doença que se desenvolve por processos complexos e multifatorial (KELLER et al., 2013), o qual tem aumentado sua prevalência no homem (EMAMI; COREY, 2007). De acordo com os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são esperados no Brasil para o ano de 2016, 61.200 mil novos casos, sendo a segunda neoplasia mais incidente em homens, ficando atrás apenas do câncer de pele não melanoma (INCA, 2015). Nos Estados Unidos de acordo com o *National Cancer Institute* (NCI), estima-se 180.890 mil novos casos e 26.120 mil casos de morte decorrente desta neoplasia (SIEGEL et al., 2015).

Uma das vias de sinalização amplamente estudada na oncologia humana é a WNT/ β -Catenina canônica, que participa de processos importantes na embriogênese e patogênese (VERRAS; SUN, 2006; YU et al., 2009). A desregulação da sinalização da WNT ativa, de forma desordenada, alguns genes alvo desta via (JAMIESON et al., 2012), podendo levar a múltiplas síndromes hereditárias e câncer, inclusive o prostático (LI et al., 2012). O passo chave para essa regulação, envolve um complexo de destruição da β -catenina, principal mediador da via WNT no núcleo (YU et al., 2009; LI et al., 2012). Quando não há sinalização WNT este complexo, que se constitui pelo APC (*adenomatous polyposis coli*) e outras proteínas, degrada a β -catenina presente no citosol e impede seu acúmulo (YU et al., 2009; STAMOS; WEIS, 2013). A metilação do APC na próstata humana é uma das alterações epigenéticas estudadas e associadas com mortalidade (RICHIARDI et al., 2009), e possivelmente correlacionada com a não degradação da β - catenina no citoplasma, em humanos (WANG et al., 2014).

A β -catenina também é um componente essencial no complexo de adesão celular com a E-caderina na superfície celular, sendo importante na formação e função da glândula prostática (KYPTA; WAXMAN, 2012). Durante a carcinogênese, a ausência de E- caderina e β -catenina na membrana está associada com invasão ao tecido adjacente e metástase, observado em cães (FONSECA-ALVES et al., 2015) e humanos (SCHMALHOFER et al., 2009). Em cães, também é abordada a dinâmica da E-caderina durante o ciclo celular e

carcinogênese, em que pode ocorrer perda e ganho de expressão durante o desenvolvimento do câncer prostático (FONSECA-ALVES et al., 2013). Além disso, a entrada no ciclo celular para posterior proliferação se dá com a diminuição da E-caderina, o que poderia ocorrer na proliferação de células do CaP e não em células em repouso cancerígenas, justificando assim a heterogeneidade de expressão nos CaP (FONSECA-ALVES et al., 2013). O papel da E-caderina em cães também é demonstrada em lesões pré-neoplásicas as quais são semelhantes em humanos, com perda de expressão membranosa quando comparada às próstatas normais e hiperplásicas (RODRIGUES et al., 2013a).

A Caveolina-1 (CAV-1) pertence a outra família de proteínas de membrana, as caveolinas, componentes estruturais da superfície das cavéolas. Estas por sua vez, são invaginações na membrana plasmática e possuem funções de transporte, sinalização, adesão celular e mecanotransdução de membrana (YANG et al., 2005; QUEST et al., 2012; NASSAR et al., 2013). No processo de carcinogênese a CAV-1 apresenta papel importante por regular a proliferação celular (GUMULEC et al., 2012), ativa a via de sinalização PI3-K-AKT e genes alvo do AKT envolvidos na inibição de apoptose (YANG et al., 2012); e esta função anti apoptótica auxilia no processo de metástase (YANG et al., 2005).

REVISÃO DE LITERATURA

ANATOMIA

A próstata canina é a única glândula sexual do cão, bilobada, com elementos glandulares e estromais, possui formato redondo a ovóide, sulco dorsal e ventral, circunda a uretra caudal ao colo da vesícula urinária e é recoberta por uma cápsula fibromuscular (JOHNSTON et al., 2000; SMITH, 2008).

No homem, a próstata possui divisão anatômica em zonas prostáticas: zonas periférica e central que correspondem as duas maiores regiões glandulares da próstata, zona de transição localizada próxima a uretra e zona fibromuscular anterior, porção não glandular (MCNEAL, 1968), diferentemente do cão que não possui regiões anatômicas diferenciadas (ROSOL et al., 2003).

Em animais jovens a próstata localiza-se predominantemente na região pélvica, porém com a maturidade sexual e consequente aumento de tamanho em razão da elevada concentração da testosterona sanguínea, a glândula assume uma posição mais abdominal (L'EPLATTENIER, 2009).

HISTOLOGIA

A próstata é uma glândula sexual dos cães machos e apresenta variação histológica de acordo com a maturidade sexual do animal (DORSO et al., 2008). Basicamente, é composta por um epitélio limitado por uma ou duas camadas de células cuboides a colunares, ácinos desenvolvidos com projeções digitiformes para o interior do lúmen (DORSO et al., 2008). As células acinares apresentam citoplasma eosinofílico granular (ROSSIGNOL et al., 2004). O estroma é fibroso, por vezes contendo septos de músculo liso, alterando-se de acordo com a maturidade sexual (FONSECA-ALVES et al., 2010), dividindo o tecido glandular em lóbulos (L'EPLATTENIER, 2009)

AFECÇÕES PROSTÁTICAS

ATROFIA INFLAMATÓRIA PROLIFERATIVA (PIA)

A PIA é uma lesão prostática, considerada uma lesão pré neoplásica na espécie humana (De MARZO et al., 1999) e canina (TOLEDO et al., 2010; FONSECA-ALVES et al., 2013; PALMIERI et al., 2014). Caracteriza-se por epitélio prostático displásico e atrófico com mais de uma camada celular atípica, associado a processo inflamatório mononuclear intersticial, classificadas histologicamente em difuso e focal (TOLEDO et al., 2010)

Há uma estimativa que em 20% das neoplasias humanas há inflamação associada (OMABE; EZEANI, 2011). A hipótese que a inflamação pode estar relacionada com o progresso para um carcinoma prostático é devido ao microambiente tumoral favorável (DE NUNZIO et al., 2011; OMABE; EZEANI, 2011). A baixa prevalência de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) nas lesões prostáticas em cães (ROSSIGNOL et al., 2004) foi representada também em estudo prévio de nosso grupo de pesquisa (FONSECA-ALVES et al., 2013), o qual revelou ausência desta lesão nos fragmentos prostáticos estudados e alta frequência de PIA. Previamente, foi demonstrado o potencial pré-neoplásico da PIA através de estudos imuno-histoquímicos que

identificaram a perda de E-caderina (AKTER et al., 2015) e a superexpressão de vimentina (RODRIGUES et al., 2011; FONSECA-ALVES et al., 2013). Esses resultados fortalecem a hipótese de que a PIA é uma lesão pré-neoplásica e novos estudos são necessários para caracterizar essa lesão em cães. Apesar de Waters e Bostwick (1997) descrevem o PIN como uma lesão pré-neoplásica frequente, nenhum estudo recente identificou casos significativos de PIN.

NEOPLASIA PROSTÁTICA

Em meados do século 20 começaram os estudos retrospectivos com neoplasias prostáticas em animais de companhia, e a escolha da próstata canina foi em consequência às semelhanças anatômicas com a próstata humana, além de o cão ser o único grande mamífero a apresentar incidência significativa em neoplasias prostáticas espontâneas (LEROY; NORTHRUP, 2009). Similarmente aos humanos, os cães apresentam neoplasias prostáticas geralmente quando idosos e o crescimento frequentemente é expansivo e exofítico (TESKE et al., 2002). Além disso, os carcinomas prostáticos em ambos tem uma grande propensão para desenvolver metástases ósseas (osteotropismo) (HENSEL; THALMANN, 2016). Dentre as neoplasias prostáticas caninas, relatou-se carcinoma prostático (CaP) como a mais comum, além de carcinoma de células de transição, carcinoma de células escamosas, fibrossarcoma, leiomiossarcoma, e raramente linfoma (GALVÃO et al., 2011).

Ainda é discutida a origem celular precisa dos carcinomas prostáticos, podendo provir tanto do epitélio glandular quanto ductal ou urotélio da uretra prostática (LEROY et al., 2004). Alguns autores citam a correlação das células basais com o surgimento direto das lesões prostáticas, além de apresentarem um importante papel no desenvolvimento dos CaP (FONSECA-ALVES et al., 2013; AKTAR et al., 2015). Terazaki (2009) comparou neoplasias intraepiteliais prostáticas (PIN) e próstatas caninas normais, e revelou pelo método imuno-histoquímico uma marcação positiva maior para p63 nas células basais das neoplasias intraepiteliais prostáticas (PIN), diminuição focal na marcação para Receptor de Andrógeno (AR) e aumento da marcação para Ki67, sugerindo um papel importante das células basais na carcinogênese e sua evolução no câncer prostático independente de receptor de andrógeno, além de colaborar

para hipótese de que as células tronco podem estar localizadas no compartimento basal da próstata.

Os CaP são tumores altamente invasivos e malignos que acometem cães castrados e inteiros (JOHNSTON et al., 2000; SMITH, 2008). Há relatos de metástases em ossos, pulmão, linfonodos, fígado, baço, intestino grosso, vesícula urinária, coração, rins e glândulas adrenais, sendo que os casos de metástases ósseas estão relacionado com carcinomas prostáticos de alto grau (JOHNSTON et al., 2000).

Ainda não há um consenso nas classificações histológicas dos carcinomas prostáticos caninos, entretanto, Palmieri et al.(2014) propôs uma nova classificação de acordo com o padrão de crescimento das células epiteliais. Dentre os padrões histológicos destacam-se o papilar, cribriforme (com ou sem comedonecrose), sólido (indiferenciado), pequenos ácinos/ductal, anel de sinete e mucinoso. Recentemente, o escore de Gleason em cães (figura 1) também foi proposto, através de um sistema de graduação semelhante ao do homem, em escores 1, 2 e 3 que representam os tumores com morfologia mais próxima das glândulas prostáticas normais, e escores 4 e 5 em que a arquitetura glandular é perdida (PALMIERI; GRIECO,2015)

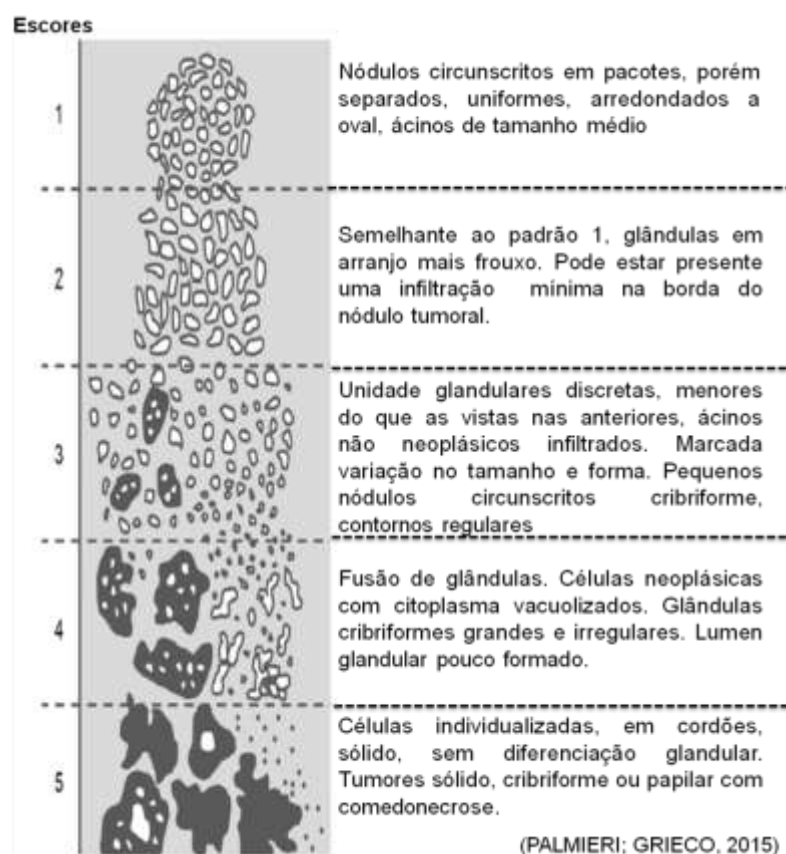


Figura 1. Diagrama esquemático do sistema de escore de Gleason modificado (PALMIERI; GRIECO, 2015).

CARCINOGENESE

Existem multifatores associados às causas do câncer prostático como por exemplo fatores genéticos, epigenéticos, ambientais, hormonais, infecção crônica, inflamação, entre outros, em que são estudados para melhor avaliação na patogenia (DE MARZO et al., 2007). Em consequência da complexidade de fatores etiológicos envolvidos, o tratamento para o câncer prostático em pacientes humanos também é variável, de acordo, por exemplo, com a idade do paciente, graduação tumoral e condição geral do paciente (BAETKE et al., 2012).

Em humanos, 20% das neoplasias em adultos estão associadas com um fator ambiental, infeccioso ou ambos (DE MARZO et al., 2007), e nas neoplasias prostáticas caninas também há evidências dessa mesma relação na etiopatogenia, em um quinto das neoplasias prostáticas (OMABE; EZEANI, 2011). O processo inflamatório pode iniciar o processo de carcinogênese por acarretar dano celular e genômico, criar um microambiente tumoral favorável para a replicação celular, tumorigênese e reparação tecidual, desencadeando substituição celular (PALAPATTU, 2004). Fatores ambientais e dieta também têm sido estudados na correlação da carcinogênese em neoplasias prostáticas e mamárias em humanos (GROVER; MARTIN, 2002). Apesar da idade ser um fator de risco estabelecido, havendo incidência de 80% em homens acima de 80 anos (CHIAM et al., 2014) as consequências moleculares não estão bem estabelecidas, porém há estudos realizados com genes envolvidos no estresse oxidativo e morte celular correlacionando-os com o avançar da idade (SHEN; ABATE-SHEN, 2010).

Alterações genéticas, como mutações, e mudanças epigenéticas, também contribuem para a transformação e progressão tumoral prostático (LI et al., 2005). As pesquisas relacionadas com a carcinogênese facilitam as estratégias relacionadas com prevenção, diagnóstico e tratamento das neoplasias prostáticas. Além de que os estudos correlacionados com epidemiologia e aspectos moleculares poderão ser analisados sob influência da dieta, ambiente e fatores possivelmente carcinogênicos, e assim avaliar as

possíveis intervenções terapêuticas durante o desenvolvimento das neoplasias prostáticas (SHEN; ABATE-SHEN, 2010).

VIA WNT CANÔNICA/ β - CATENINA

A WNT é uma glicoproteína secretada, que possui importantes papéis no desenvolvimento embrionário e homeostase de tecidos adultos (KYPTA; WAXMAN, 2012). A via WNT atua inclusive no desenvolvimento da próstata e geralmente apresenta-se inativa nas células normais da próstata (VALKENBURG et al., 2014). A ativação desta via, além de resultar em proliferação e diferenciação, também gera instabilidade genética, migração celular e apoptose (FODDE; TOMLINSON, 2010).

Existem duas famílias de receptores importantes na via de sinalização WNT canônica/ β -catenina: o receptor transmembrana Frizzled e o receptor LDL relacionado as proteínas 5 e 6 (LRP5 e LRP6) (MACDONALD et al., 2009). Existem diversas proteínas que previnem a interação da proteína com esses receptores, inibindo assim a ligação da WNT com seu receptor (VERRAS; SUN, 2006). Esses antagonistas da glicoproteína WNT pertencem a duas famílias: sFRP, incluindo WIF-1 e classe DKK, as quais se ligam diretamente nas WNTs, alterando a habilidade de ligação com os receptores (KAWANO, 2003). Quando a glicoproteína WNT está ligada a seus antagonistas a via permanece inativada, portanto a β -catenina é fosforilada e ubiquitinada, através do complexo de destruição APC/AXIN/GSK-3 β (ANASTAS; MOON, 2012) seguindo para degradação proteossomal (figura 2) (SIMONS et al., 2012). A β -catenina é apresentada a proteossoma através da sua interação com a proteína F-box contendo uma proteína adaptadora (E3-ligase B- TRCP) que forma um complexo de ubiquitinação (STAMOS; WEIS, 2013).

Com a ativação da via (figura 3) através da ligação da glicoproteína WNT com seu receptor, a AXIN é recrutada para a porção fosforilada do receptor LRP e ocorre a supressão da atividade da GSK-3, inibindo a ubiquitinação da β -catenina, com consequente saturação de β -catenina fosforilada no citoplasma e translocação para o núcleo (CLEVERS; NUSSE, 2012). No núcleo, ela se associa com o as proteínas TCF/LEF-1 e ativa a transcrição de genes, como por exemplo, *MYC*, *MMP7* e *VEGF* (LEAN et al., 2014)

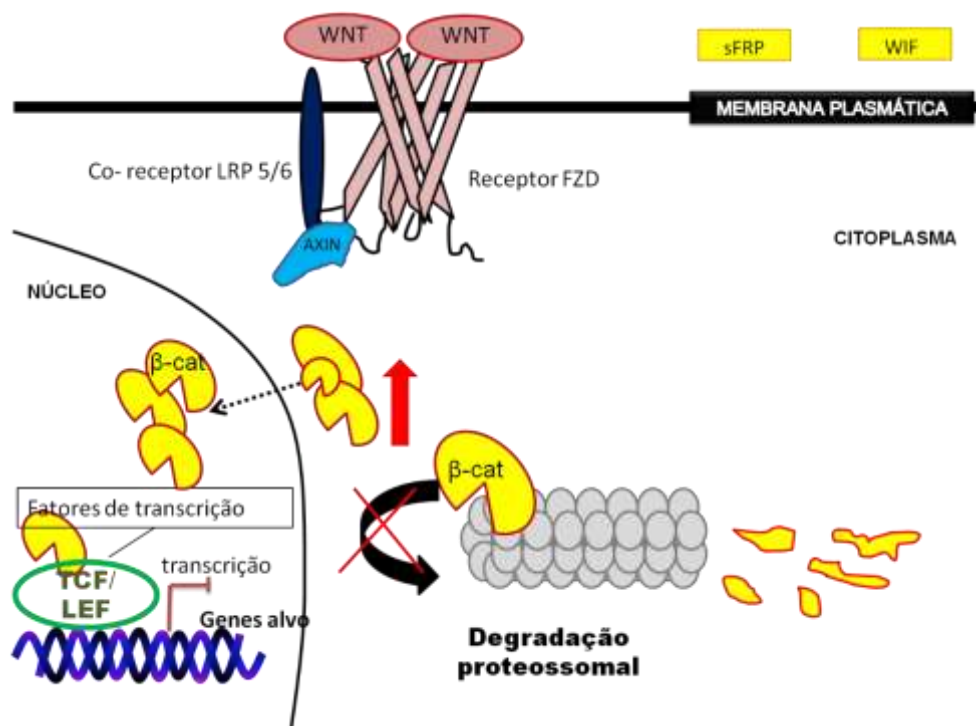


Figura 2. Via WNT canônica desativada com degradação proteossomal da β -catenina. Adaptado de MacDonald et al.(2009)

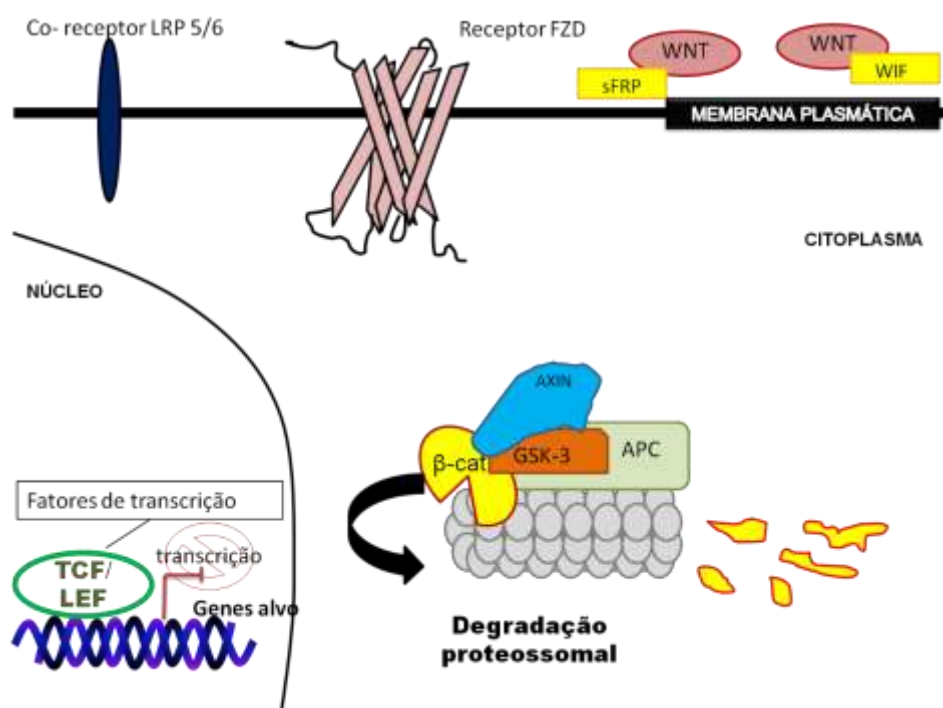


Figura 3. Via WNT canônica ativada, sem degradação proteossomal da β -catenina e acúmulo no citoplasma, consequente translocação para o núcleo e ativação dos genes alvo. Adaptado de MacDonald et al.(2009)

CAVEOLINA-1 (CAV-1)

As cavéolas são microdomínios lipídicos, ricos em esfingolipídeos e colesterol, possuem um importante papel na degradação do colesterol, mediação de transporte molecular, adesão celular e transdução de sinal (YANG et al., 1999; GUMULEC et al., 2012) . Além disso, apresentam-se em diferentes tecidos sob diferentes formas estruturais, como por exemplo, individualizada em formato de vesícula invaginante na membrana basal, em agrupamentos que se assemelham a rosetas e cachos de uva, em túbulos alongados ou formando canais transcelulares (RAZANI et al.,2002) .

A caveolina é uma proteína integral de membrana e uma importante porção integral das cavéolas (SOTGIA et al., 2012). Há três tipos de caveolinas que se diferem pela estrutura molecular e distribuição tecidual: a caveolina-1 (CAV-1) está presente em adipócitos, músculo liso, pneumócitos tipo I, fibroblastos e endotélio, e é o componente estrutural principal das cavéolas (YANG et al.,1999; LISANTI, 2002; RAZANI et al.,2002; GUMULEC et al., 2012), geralmente está co-expressa com a caveolina-2, enquanto que a caveolina-3 é mais restrita a células da glia e musculares (QUEST et al., 2013).

A habilidade da CAV-1 e cavéolas de modular a sinalização tem um importante papel para a transformação e formação tumoral, além de a CAV-1 ter sido relatada com propriedades supressoras tumoral em modelos murinos *in vivo* em glândula mamária e pele (WILLIAMS; LISANTI, 2005). Esse papel supressor está correlacionado devido a localização da CAV-1 em uma região geralmente deletada em muitas neoplasias humanas (ALSHENAWY; ALI, 2013).

Possui também relação com a resistência a múltiplas drogas, como por exemplo, em linhagens celulares de câncer de cólon e resistência ao medicamento Taxol por linhagens celulares de câncer do pulmão, e pode ser o mecanismo relacionado a resistência dos casos de câncer prostático à terapias com taxanos (YANG et al., 1998; LAVIE et al.,2001; KARAM et al., 2007) .

Um alto nível de CAV-1 intracelular está associado com a progressão metastática de câncer prostático humano, em parte devido a sua função anti apoptótica nas células tumorais (YANG et al., 2005), porém dependendo do

contexto molecular e órgão, pode apresentar atividade apoptótica (KARAM et al., 2007). Pacientes com avançado câncer prostático apresentam alto nível sérico de CAV-1, o que sugere um efeito promotor tumoral da mesma (KLEIN et al., 2015).

O aumento de CAV-1 também aumenta a translocação do receptor de andrógeno fosforilado para o núcleo e potencializa a atividade de sobrevivência do andrógeno, desta forma as células do carcinoma prostático com níveis de CAV-1 altos são mais resistentes a apoptose induzida pela castração (YANG et al., 2005).

Tahir et al., 2008 correlacionaram a CAV-1 com a regulação das células endoteliais no processo de proliferação, diferenciação e estabilização, sendo que o aumento de CAV-1 e densidade vascular estavam associadas na metástase e pior prognóstico em carcinoma renal em humanos. No caso de câncer prostático humano, o papel pró angiogênico da CAV-1 também foi relatado, além de relacionaram o aumento de CAV-1 com tumores com alto escore de Gleason, metástases para linfonodos, margens cirúrgicas comprometidas e maior probabilidade de recorrência em pacientes tratados com prostatectomia radical (KARAM et al., 2007). De acordo com Yang et al.(2005) o CAV-1 pode colaborar com o c-MYC para facilitar a progressão tumoral e ambos devem ser analisados como fator prognóstico para recorrência tumoral. Apesar do seu importante papel no desenvolvimento das neoplasias em homens, nos cães, não existem dados prévios na literatura sobre o papel desta proteína no carcinoma prostático canino.

β-CATENINA

A β-catenina pode ser encontrada predominantemente em três localizações: na membrana plasmática associada a E-caderina, no núcleo onde promove a transcrição de genes alvo com os fatores de ligação ao DNA (Tcf/Lef) e no citoplasma associado a um complexo multiproteico formado basicamente por GSK3, AXIN e APC(ALSHENAWY; ALI, 2013). A proteína β-catenina está envolvida basicamente em dois processos independentes: adesão celular e transdução de sinal (CHEN et al., 2004)

Na membrana plasmática a ligação da β-catenina com caderinas é importante para a organização estrutural e função das caderinas (LÓPEZ-

KNOWLES et al., 2010), ainda os níveis e localização celular da β -catenina também são controlados pela E-caderina, (ALSHENAWY; ALI, 2013). A β -catenina liga-se através do domínio intracelular da E-caderina de forma direta e a α -catenina liga-se de forma indireta através de sua ligação com a β -catenina (DRIVALOS et al., 2011; MORGAN et al., 2013).

A perda da β -catenina na membrana está relacionada com a progressão tumoral (RODRIGUES et al., 2013b), invasão e metástase prostática (FONSECA-ALVES et al., 2015).

A desregulação da via de sinalização WNT gera excessivo acúmulo de β -catenina nuclear e ativação desapropriada de genes alvo, causando diversas doenças inclusive o câncer (JAMIESON et al., 2012).

APC

O gene *APC* é um supressor tumoral, conhecido por ser expresso na próstata humana e amplamente envolvido no início do desenvolvimento dos carcinomas de cólon (POLAKIS, 1997; BRUXVOORT et al., 2007). Foram relatadas frequentes perdas de alelo no locus *APC*, 5q21 em neoplasias prostáticas primárias avançadas no homem (WATANABE et al., 1996). As alterações tanto somáticas quanto promotoras de hipermetilação do gene *APC* foram identificadas em neoplasias prostáticas primárias e metastáticas (BRUXVOORT et al., 2007). Richiardi et al. (2013) encontraram um aumento de 50% de risco de mortalidade em câncer prostático correlacionado com a metilação do gene *APC* em tecido prostático.

Em ratos, observou-se que a deleção do gene *APC* nas células prostáticas luminais normais levou ao desenvolvimento de uma lesão pré neoplásica (neoplasia intra-epitelial de alto grau) (VALKENBURG et al., 2015), porém raramente havia progressão para câncer invasivo e não foram encontradas metástases (BJERKE et al., 2014).

A proteína APC está envolvida em processos como a apoptose e migração celular, além de atuar como antagonistas da via WNT (WANG et al., 2015), pois forma um complexo APC/Axin/Gsk-3 de degradação da β -catenina que previne a atividade aberrante da via de sinalização WNT (CHAW et al., 2012). Nos casos de metilação do gene *APC*, as possíveis alterações encontradas estão esquematizadas nas figuras 4 e 5.

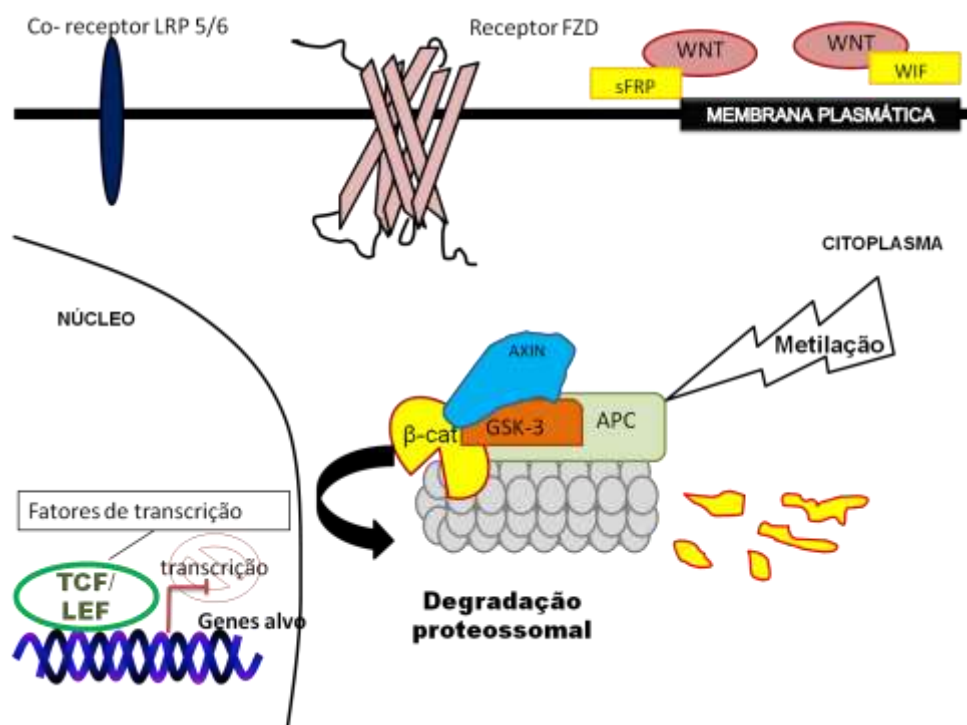


Figura 4. Metilação do gene APC. Adaptado de MacDonald et al.(2009)

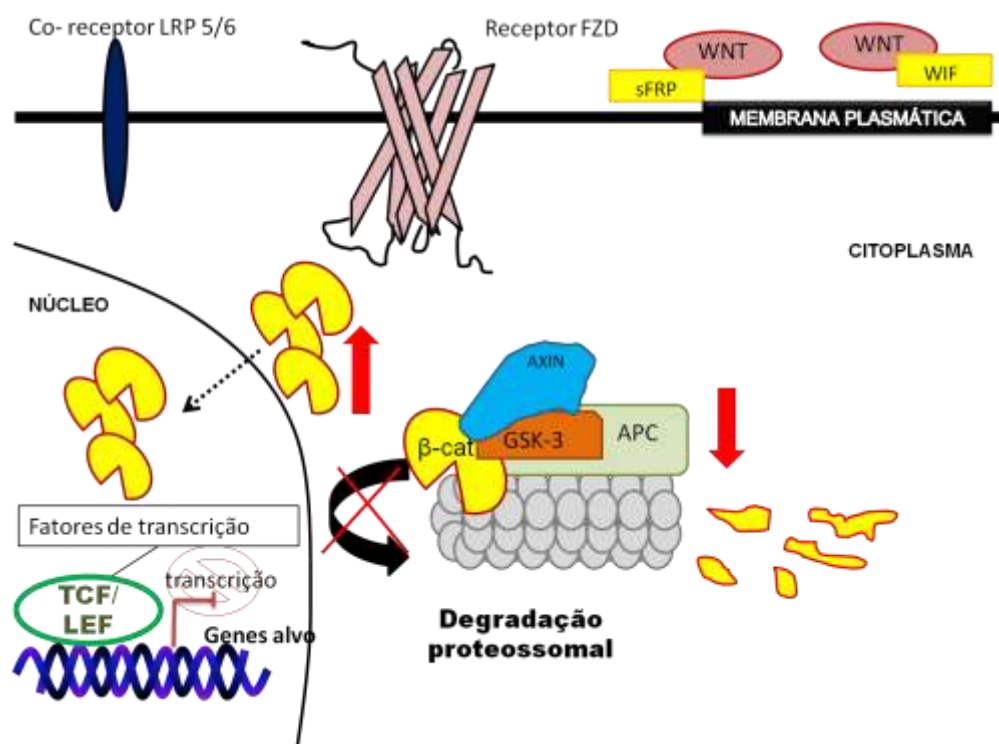


Figura 5. Após metilação do gene APC, há silenciamento do gene e consequentemente apresenta expressão proteica, impedindo a formação do complexo de destruição APC/ GSK-3/AXIN, permitindo o acúmulo da β-catenina citoplasmática. Adaptado de Wang et al.(2014)e MacDonald et al.(2009)

E-CADERINA

As caderinas são glicoproteínas transmembrana que fazem a mediação da adesão intercelular na presença do cálcio extracelular (DRIVALOS et al., 2011). A E-caderina possui três domínios: extracelular, transmembrana e citoplasmático (KIM et al., 2012). A ligação inter epitelial da E-caderina serve de mediador para adesão celular em tecidos secretórios como próstata e glândula mamária, garantindo a manutenção da morfologia tecidual e sua diferenciação (JAGGI et al., 2005).

A redução da adesão celular resulta em perda da polaridade celular e altera a estrutura histológica do tecido (JAGGI et al., 2005). A perda da E-caderina membranosa tem sido associada com a transição epitelial-mesenquimal, em que ocorre a mudança reversível do fenótipo celular de epitelial para mesenquimal, facilitando assim a migração celular, (FALEIRO-RODRIGUES et al., 2004; FONSECA-ALVES et al., 2015).

O gene da E-caderina, CDH1, está localizado no cromossomo 16q22, em humanos, e raramente encontra-se mutado, portanto o mecanismo da diminuição de expressão proteica é controversa, incluindo além da mutação, a metilação do DNA e modificações pós translacional (RUBIN et al., 2001)

Além disso, a via WNT pode induzir o aumento dos membros da família Snail (repressor da E-caderina) e conseqüentemente diminui a expressão de E-caderina (CERVANTES-ARIAS et al., 2013).

JUSTIFICATIVA

Não há estudos das proteínas Caveolina-1 e APC em próstatas normais, HPB, PIA, CaP e suas metástase em cães, além de sua importância conjunta com as proteínas β -catenina e E-Caderina. Portanto, este trabalho visa avaliar a expressão proteica, pela técnica de imuno-histoquímica, dessas proteínas no processo da carcinogênese e metástases prostáticas, igualmente importantes tanto no homem quanto no cão. Além disso, analisar se há metilação no gene APC a fim de verificar se o mecanismo de alteração epigenética é o mesmo em homens e em cães, já que é indicado como um potencial marcador diagnóstico em humanos.

Baseado nas semelhanças entre as afecções prostáticas caninas e humanas e considerando a elevada prevalência em cães, a presente pesquisa busca o melhor entendimento da expressão gênica e proteica dos genes *E-Caderina*, *β-catenina*, *Caveolina-1* e *APC* nas principais alterações prostáticas do cão, e seu papel na progressão tumoral, a fim de validar o cão como um modelo natural de doença prostática para testes clínicos futuros. Além disso, o melhor entendimento da doença permite um diagnóstico prévio, melhorias no tratamento e consequente melhor qualidade de vida dos animais acometidos.

OBJETIVOS

- Avaliar a expressão gênica e proteica das proteínas APC, E-caderina, β -catenina e Caveolina-1 através das técnicas de RT-qPCR e imunohistoquímica, respectivamente, e avaliá-las nas próstatas normais, atrofia inflamatória proliferativa (PIA), carcinomas prostáticos (CaP) e metástases.
- Analisar se há metilação do gene APC nas próstatas normais, PIA e carcinomas prostáticos, alteração epigenética envolvida em carcinomas prostáticos humanos e estudadas como potencial marcador diagnóstico.

CAPÍTULO 2- TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista *Veterinária e Zootecnia*

PROCESSO CARCINOGENICO DAS PRÓSTATAS CANINAS: VIA WNT CANÔNICA E SEU ESTUDO COMPARADO

CARCINOGENIC PROCESS OF CANINE PROSTATE: WNT CANONICAL PATHWAY AND ITS COMPARATIVE STUDY

PROCESO CARCINOGENICO DE LAS PRÓSTATAS CANINAS: VIA WNT CANÓNICA Y SU ESTUDIO COMPARADO

RESUMO

A espécie canina apresenta semelhanças com a espécie humana com relação às lesões prostáticas, sendo a única espécie a apresentar tumores espontâneos e com frequência, desse modo representa um importante modelo para estudo comparativo de afecções desta glândula. O desenvolvimento das neoplasias prostáticas é multifatorial e dentre eles, alterações genéticas e epigenéticas estão envolvidas, portanto o cão pode ser um modelo natural e espontâneo para o estudo das lesões pré neoplásicas e neoplásicas da próstata, com futuro alto potencial de ser utilizado como modelo em testes pré clínicos de medicamentos. Uma das vias importantes para o desenvolvimento dos carcinomas prostáticos é a WNT canônica, dependente da proteína β -catenina. Nesta revisão, abordaremos o papel desta via e sua participação na carcinogênese prostática, importante em humanos e cães, além de algumas proteínas envolvidas na regulação da mesma.

Palavras-chave: carcinoma prostático canino, oncologia comparada, cães, via WNT .

ABSTRACT

Prostate of dogs have similar lesions to that observed in human and is the only species other than man which frequently exhibits spontaneous prostatic tumors. In this way, the dog represent an important model of studying different prostatic

affections. The prostate cancer development is multifactorial and among them, genetic and epigenetic alterations are involved. The dog can be a natural and spontaneous model to study preneoplastic and neoplastic lesions, with potential future studies as models for pre –clinical tests. One of important pathway to prostate carcinogenesis is beta catenin dependent canonical WNT pathway. In this paper, we review the role of this pathway in prostate carcinogenesis, important in humans and dogs, besides some regulatory proteins involved in this pathway.

Key words: canine prostate carcinoma, compared oncology, dogs, WNT pathway

RESUMEN

La especie canina presenta semejanza con la especie humana con relación a las lesiones prostáticas. Es la única especie en presentar tumores espontáneos con frecuencia, de esta manera representa un importante modelo para estudio comparativo de afecciones de la glándula. El desarrollo de las neoplasia prostáticas es una enfermedad con causas multifactoriales, entre estas, alteraciones genéticas y epigenéticas están involucradas. Por lo tanto, el perro puede ser un modelo natural y espontaneo para el estudio de lesiones pre-neoplásicas e neoplásicas de próstata canina. En el futuro, podrá ser utilizado como modelo en pruebas pre-clínicas de medicamentos, como ya fue realizado para osteosarcoma, por ejemplo. Una de las vías importantes para el desarrollo de los carcinomas prostáticos es la WNT canónica dependiente de la proteína β -catenina. En esta revisión abordaremos el papel de esta vía y su participación en la carcinogénesis prostática, importante en humanos y perros, además de algunas proteínas involucradas en la regulación de la misma.

Palabras claves: Carcinoma prostático canino, oncología comparada, perros, via WNT.

INTRODUÇÃO

A próstata é a única glândula sexual do cão, possui dois lobos: direito e esquerdo, formato ovoide, e envolve a uretra caudal ao colo da vesícula urinária (1). Em cães, notam-se afecções prostáticas espontâneas semelhantes aos humanos: hiperplasia prostática benigna (HPB), atrofia inflamatória proliferativa (PIA) (2) e carcinoma prostático (CaP) (3).

No Brasil são esperados para o ano de 2016, 61.200 mil novos casos, sendo a segunda neoplasia mais incidente em homens, ficando atrás apenas do câncer de pele não melanoma (4).

Os cães domésticos são considerados excelentes modelos para estudos de doenças e neoplasias em humanos, bem como o tratamento, a exemplo de linfomas, carcinoma mamário, osteossarcoma, melanoma e sarcoma de partes moles (5). Aproximadamente 400 doenças genéticas semelhantes aos humanos estão definidas, tais como câncer, doenças cardíacas e neurológicas. Devido os cães e o homem dividirem o mesmo ambiente, este fato contribui para o estudo dos fatores ambientais e evolução das doenças (6). Através de um estudo epidemiológico com linfoma canino, Zanini et al., 2013 (7) correlacionaram a poluição advinda dos transportes veiculares com o desenvolvimento dos linfomas caninos. Em seu estudo os autores avaliaram na cidade de São Paulo as regiões com maior incidência de casos de linfoma em cães e compararam com os dados humanos e concluíram que as regiões coincidem nas duas espécies, uma evidência que os mesmo fatores devem estar causando a doenças no homem e no cão.

A ocorrência natural de neoplasias em animais contribui para os estudos em angiogênese, oncogênese, metástases e mecanismos de iniciação e promoção molecular (5).

Os modelos em estudos de câncer prostático têm aumentado o conhecimento sobre a doença, tais como, grandes variedades de modelos em ratos transgênicos, xenoenxertos e inativação gênica (8), além de estudos em cães, devido às suas semelhanças ao homem, em relação no desenvolvimento e curso clínico da doença (9).

Em meados do século 20 começaram os estudos retrospectivos com neoplasias prostáticas em animais de companhia, e a escolha da próstata canina foi em consequência às semelhanças anatômicas com a próstata

humana, além de o cão ser o único grande mamífero a apresentar incidência significativa em neoplasias prostáticas espontâneas (5). Similarmente aos humanos, os cães apresentam neoplasias prostáticas geralmente quando idosos e o crescimento frequentemente é expansivo e exofítico. Além disso, os carcinomas prostáticos em ambos tem uma grande propensão para metastatizar em ossos (3).

As pesquisas sobre as neoplasias prostáticas são de extrema relevância para melhor compreensão sobre o desenvolvimento da doença, sendo assim, os modelos animais vêm para auxiliar neste processo (9). Os estudos com marcadores moleculares e vias da carcinogênese prostática podem adicionar dados às informações clínicas, diagnósticas e terapêuticas, podendo inclusive prever a progressão tumoral em um estágio inicial do câncer (10).

Uma das vias de sinalização amplamente estudada na oncologia humana é a WNT/ β -Catenina canônica, que participa de processos importantes na embriogênese e patogênese (11,12). A desregulação da sinalização da WNT ativa, de forma desordenada, alguns genes alvo desta via (13), podendo levar a síndromes múltiplas hereditárias e câncer, inclusive o prostático (14). O passo chave para essa regulação, envolve um complexo de destruição da β -catenina, principal mediador da via WNT no núcleo (12,14). Quando não há sinalização WNT este complexo, que se constitui pelo APC (*adenomatous polyposis coli*) e outras proteínas, degrada a β -catenina presente no citosol e impede seu acúmulo (12,15). A metilação do APC na próstata humana é uma das alterações epigenéticas estudadas e associadas com mortalidade (16), e possivelmente correlacionada com a não degradação da β -catenina no citoplasma, em humanos (17).

A β -catenina também é um componente essencial no complexo de adesão celular com a E-caderina na superfície celular, sendo importante na formação e função da glândula prostática (18). Durante a carcinogênese, a ausência de E-caderina e β -catenina na membrana está associada com invasão ao tecido adjacente e metástase, observado em cães (19) e humanos (20). Em cães, também é abordada a dinâmica da E-caderina durante o ciclo celular e carcinogênese, em que pode ocorrer perda e ganho de expressão durante o desenvolvimento do câncer prostático (21). Além disso, a entrada no

ciclo celular para posterior proliferação se dá com a diminuição da E-caderina, o que poderia ocorrer na proliferação de células do CaP e não em células em repouso cancerígenas, justificando assim a heterogeneidade de expressão nos CaP (21). O papel da E-caderina em cães também é demonstrada em lesões pré-neoplásicas as quais são semelhantes em humanos, com perda de expressão membranosa quando comparada às próstatas normais e hiperplásicas (22).

REVISÃO DE LITERATURA

ANATOMIA

A próstata canina é uma glândula bilobulada, com elementos glandulares e estromais, possui formato redondo a ovóide, sulco dorsal e ventral, circunda a uretra caudal ao colo da vesícula urinária e é recoberta por uma cápsula fibromuscular. Sendo esta, a única glândula acessória sexual do cão (1); (23). Em animais jovens a próstata localiza-se predominantemente na região pélvica, porém com a maturidade sexual e consequente aumento de tamanho em razão da elevada concentração da testosterona sanguínea, a glândula assume uma posição mais abdominal (24).

HISTOLOGIA

A próstata é uma glândula sexual dos cães machos e apresenta variação histológica de acordo com a maturidade sexual do animal. Basicamente, é composta por um epitélio limitado com por uma ou duas camadas de células cuboides a colunares (25). Há ácinos desenvolvidos e projeções digitiformes para o interior do lúmen. O estroma é fibroso, por vezes contendo septos de músculo liso, alterando-se de acordo com a maturidade sexual (26).

ATROFIA INFLAMATÓRIA PROLIFERATIVA (PIA)

A PIA é uma lesão prostática, considerada uma lesão pré neoplásica na espécie humana (27) e canina (2)(21). Caracteriza-se por epitélio prostático displásico e atrófico com mais de uma camada celular atípica, associado a processo inflamatório mononuclear intersticial, classificadas histologicamente em difuso e focal (2).

Há uma estimativa que 20% das neoplasias prostáticas humanas são resultantes das inflamações crônicas (28). A hipótese que a inflamação pode estar relacionada com o progresso para um carcinoma prostático é devido ao microambiente tumoral favorável (29).

A baixa prevalência de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) nas lesões prostáticas em cães (30) foi representada também em estudo prévio da nossa equipe (21) o qual revelou ausência desta lesão nos fragmentos prostáticos estudados e alta frequência de PIA.

NEOPLASIA PROSTÁTICA

Dentre as neoplasias prostáticas caninas, relatou-se carcinoma prostático (CaP) como a mais comum, além de carcinoma de células de transição, carcinoma de células escamosas, fibrossarcoma, leiomiossarcoma, e raramente linfoma (31).

Ainda é desconhecida a origem celular precisa dos carcinomas prostáticos, podendo provir tanto do epitélio glandular quanto ductular ou urotélio da uretra prostática (32). Alguns autores citam a correlação das células basais com o surgimento direto das lesões prostáticas, além de apresentarem um importante papel no desenvolvimento dos CaP (21). Em estudo de Matsuzaki et al. (2010) (33) comparando neoplasias intraepiteliais prostáticas (PIN) e próstatas caninas normais, revelou através do método imuno-histoquímico uma marcação positiva maior para *p63* nas células basais das neoplasias intraepiteliais prostáticas (PIN), diminuição focal na marcação para Receptor de Andrógeno (AR) e aumento da marcação para Ki67, sugerindo um papel importante das células basais na carcinogênese e sua evolução no câncer prostático independente de receptor de andrógeno, além de colaborar para hipótese de que as células tronco podem estar localizadas no compartimento basal da próstata.

Os CaP são tumores altamente invasivos e malignos que acometem cães castrados e inteiros. Há relatos de metástases em ossos, pulmão, linfonodos, fígado, baço, intestino grosso, vesícula urinária, coração, rins e glândulas adrenais, sendo que nos casos de metástases ósseas está relacionado com carcinomas prostáticos de alto grau (1).

CARCINOGENESE

As causas do câncer prostático ainda não estão todas estabelecidas, porém fatores genéticos e epigenéticos, ambientais, hormonais, infecção crônica, inflamação, entre outros, estão sendo estudados e melhor avaliados na patogenia da lesão (27). Em consequência da complexidade de fatores etiológicos envolvidos, o tratamento para o câncer prostático em pacientes humanos também é variável, de acordo, por exemplo, com a idade do paciente, graduação tumoral e condição geral do paciente (34).

Em humanos, 20% das neoplasias em adultos estão associadas com inflamação desencadeadas por um fator ambiental, infeccioso ou ambos, e nas neoplasias prostáticas também há evidências dessa mesma relação na etiopatogenia em um quinto das neoplasias prostáticas (26, 28).

O processo inflamatório pode iniciar o processo de carcinogênese por acarretar dano celular e genômico, criar um microambiente tumoral favorável para a replicação celular, tumorigênese e reparação tecidual, desencadeando substituição celular (35).

Fatores ambientais e dieta também têm sido estudados na correlação da carcinogênese em neoplasias prostáticas e mamárias em humanos (36). Enquanto as consequências moleculares, devido ao avançar da idade, não estão bem estabelecidas, outros estudos têm sido feito com expressão gênica relacionado com a idade, dentre eles genes envolvidos no estresse oxidativo e morte celular (37).

As pesquisas relacionadas com a carcinogênese facilitam as estratégias relacionadas com prevenção, diagnóstico e tratamento das neoplasias prostáticas. Além de que os estudos correlacionados com epidemiologia e aspectos moleculares poderão ser analisados sob influência da dieta, ambiente e fatores possivelmente carcinogênicos, e assim avaliar as possíveis intervenções terapêuticas durante o desenvolvimento das neoplasias prostáticas (37).

β -CATENINA

A proteína β -catenina encontra-se predominantemente em três localizações: na membrana plasmática associada a E-caderina, no núcleo onde promove a transcrição de genes alvo com os fatores de ligação ao DNA

(Tcf/Lef) e no citoplasma associado a um complexo de multi proteínas formados basicamente por GSK3, AXIN e APC(38). A proteína β -catenina está envolvida basicamente em dois processos independentes: adesão celular e transdução de sinal (39).

Na membrana plasmática a ligação da β -catenina com caderinas é importante para a organização estrutural e função das caderinas (40), além de que os níveis e localização celular da β -catenina também são controlados pela E-caderina (38). A β -catenina liga-se através do domínio intracelular da E-caderina de forma direta e a α -catenina liga-se de forma indireta através de sua ligação com a β -catenina (41,42).

A perda da β -catenina na membrana está relacionada com a progressão tumoral (43), invasão e metástase prostática canina (19).

A desregulação da via de sinalização WNT gera excessivo acúmulo de β -catenina nuclear e ativação desapropriada de genes alvo, causando diversas doenças inclusive o câncer (13).

E-CADERINA

As caderinas são glicoproteínas localizadas na transmembrana que fazem a mediação da adesão intercelular na presença do cálcio extracelular (42). A E-caderina possui três domínios: extracelular, transmembrana e citoplasmático (44). A ligação inter epitelial da E-caderina serve de mediador para adesão celular em tecidos secretórios como próstata e glândula mamária, garantindo a manutenção da morfologia tecidual e sua diferenciação (45).

A redução da adesão celular resulta em perda da polaridade celular e altera a estrutura histológica do tecido (45). A perda da E-caderina na membrana tem sido associada com a transição epitelial- mesenquimal, em que ocorre a mudança reversível do fenótipo celular de epitelial para mesenquimal, facilitando assim a migração celular (18)(45). Além disso, a E-caderina presente na membrana citoplasmática funciona como um regulador negativo da via WNT canônica, pois está ligada a β -catenina. Porém com a diminuição da E-caderina, a β -catenina que estava presente na membrana citoplasmática torna-se livre e acumula no citoplasma, possibilitando a translocação para o núcleo (20).

O gene da E-caderina, CDH1, está localizado no cromossomo 16q22, em humanos, e raramente encontra-se mutado, portanto o mecanismo da diminuição de expressão proteica é controversa, incluindo além da mutação, a metilação do DNA e modificações pós translacional (47)

Além disso, a via WNT pode induzir o aumento dos membros da família Snail (repressor da E-caderina) e consequentemente diminuir a expressão de E-caderina (48).

APC

O gene *APC* é um supressor tumoral, a expressão proteica na próstata humana é relatada e amplamente envolvido no início do desenvolvimento dos carcinomas de cólon (48, 49). Foram descritas frequentes perdas de alelo no locus *APC*, 5q21 em neoplasias prostáticas primárias avançadas no homem (51). As alterações tanto somáticas quanto promotoras de hipermetilação do gene *APC* foram identificadas em neoplasias prostáticas primárias e metastáticas (50). Richiardi et al. (2013) (52) encontraram um aumento de 50% de risco de mortalidade em câncer prostático correlacionado com a metilação do gene *APC* em tecido prostático.

A proteína APC faz parte do complexo de destruição da β -catenina presente no citoplasma, promovendo a fosforilação da β -catenina e orientando-a para a degradação através da via ubiquitina-proteossoma (50).

VIA WNT CANÔNICA/ β - CATENINA

A via WNT canônica participa na embriogênese, na proliferação celular, polaridade e migração, quanto na tumorigênese (53). A via WNT atua inclusive no desenvolvimento da próstata e geralmente apresenta-se inativa nas células normais da próstata (54).

A WNT é uma glicoproteína secretada que possui importante papel no desenvolvimento embrionário e homeostase de tecidos (18).

Existem duas famílias de receptores na via de sinalização WNT canônica/ β -catenina: receptor LDL relacionado as proteínas 5 e 6 (LRP5 e LRP6) e o receptor transmembrana Frizzled (53). Há proteínas que previnem a interação da proteína com esses receptores para inibir a via de sinalização WNT (11). Existem duas famílias de antagonistas das glicoproteínas WNT: classe

DKK e a sFRP, incluindo WIF-1, ambas as classes se ligam diretamente nas glicoproteínas WNTs, alterando a habilidade de ligação com os receptores (55).

A via WNT basicamente depende da estabilização da β -catenina no citoplasma e consequente acúmulo no núcleo, sendo que os níveis de β -catenina citoplasmática são controlados através do complexo de destruição APC/AXIN/GSK-3 β (56). Com a ativação pela WNT, a AXIN é recrutada para a porção fosforilada do receptor LRP e ocorre a supressão da atividade da GSK-3, inibindo a ubiquitinação da β -catenina, com consequente saturação de β -catenina fosforilada no citoplasma e translocação para o núcleo (57). No núcleo, a β -catenina se associa com as proteínas TCF/LEF-1 e ativa a transcrição de genes alvo (58). Na ausência de WNT, a β -catenina é fosforilada e ubiquitinada, e posterior degradação proteossomal (59). A β -catenina é apresentada a proteossoma através da sua interação com a proteína F-box contendo uma proteína adaptadora (E3-ligase B- TRCP) que forma um complexo de ubiquitinação (15).

CONCLUSÃO

A via WNT canônica participa na embriogênese e carcinogênese de diversos tumores, inclusive da próstata canina e humana. A principal proteína dessa via é a β -catenina, já estudada em próstatas caninas em estudos anteriores, a qual a presença desta no núcleo ativa a via de sinalização WNT. O complexo E-caderina/ β -catenina presente na membrana plasmática e o complexo APC/ β -catenina possuem papéis importantes na regulação desta via.

Os cães apresentam papel importante no estudo da neoplasia prostática, já que além de serem animais sentinelas do homem por dividirem o mesmo ambiente, apresentam cada vez mais neoplasias devido a maior expectativa de vida desses animais. Portanto, o estudo da carcinogênese prostática canina e suas vias de ativação é necessário para melhorias no diagnóstico prévio, tratamento, melhorando a qualidade de vida deste animal e sua taxa de sobrevivência.

REFERÊNCIAS

1. Johnston S., Kamolpatana K, Root-Kustritz M., Johnston G. Prostatic disorders in the dog. *Animal Reproduction Science*. 2000 Jul;60-61:405–15.
2. Toledo DC, Faleiro MBR, Rodrigues MMP, Di Santis GW, Amorim RL, Moura VMDB De. Caracterização histomorfológica da atrofia inflamatória proliferativa na próstata canina. *Ciência Rural*. 2010 Jun;40(6):1372–7.
3. Teske E, Naan E., van Dijk E., Van Garderen E, Schalken J. Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs. *Molecular and Cellular Endocrinology* . 2002 Nov;197(1-2):251–5.
4. INCA. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil [Internet]. Estimativa | 2016 Incidência de Câncer no Brasil. 2016. 124 p.
5. LeRoy BE, Northrup N. Prostate cancer in dogs: Comparative and clinical aspects. *The Veterinary Journal*. Elsevier Ltd; 2009 May;180(2):149–62.
6. Rowell JL, McCarthy DO, Alvarez CE. Dog models of naturally occurring cancer. *Trends in Molecular Medicine* . Elsevier Ltd; 2011 Jul;17(7):380–8.
7. Zanini DA, Kimura KC, Nishiya AT, Ubukata R, Leandro RM, Brito CP de, et al. Environmental risk factors related to the development of canine non-Hodgkin's lymphoma. *Ciência Rural*. 2013 Jul;43(7):1302–8.
8. Keller JM, Schade GR, Ives K, Cheng X, Rosol TJ, Piert M, et al. A novel canine model for prostate cancer. *The Prostate* . 2013 Jun;73(9):952–9.
9. Winkler S, Escobar HM, Meyer B, Simon D, Eberle N, Baumgartner W, et al. HMGA2 expression in a canine model of prostate cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2007;177(2):98–102.
10. Yang G, Goltsov a. a., Ren C, Kurosaka S, Edamura K, Logothetis R, et al. Caveolin-1 Upregulation Contributes to c-Myc-Induced High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Prostate Cancer. *Molecular Cancer Research*. 2012;10(2):218–29.
11. Verras M, Sun Z. Roles and regulation of Wnt signaling and beta-catenin in prostate cancer. *Cancer letters* . 2006 Jun 8;237(1):22–32.
12. Yu X, Wang Y, Jiang M, Bierie B, Roy-Burman P, Shen MM, et al.

- Activation of β -Catenin in mouse prostate causes HGPIN and continuous prostate growth after castration. *The Prostate* [Internet]. 2009 Feb 15;69(3):249–62.
13. Jamieson C, Sharma M, Henderson BR. Wnt signaling from membrane to nucleus: β -catenin caught in a loop. *The international journal of biochemistry & cell biology* . Elsevier Ltd; 2012 Jun;44(6):847–50.
 14. Li VSW, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, et al. Wnt Signaling through Inhibition of β -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. *Cell*. Elsevier Inc.; 2012 Jun;149(6):1245–56.
 15. Stamos JL, Weis WI. The β -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013 Jan 1;5(1):a007898–a007898.
 16. Richiardi L, Fiano V, Vizzini L, De Marco L, Delsedime L, Akre O, et al. Promoter methylation in APC, RUNX3, and GSTP1 and mortality in prostate cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(19):3161–8.
 17. Wang L, Liu X, Gusev E, Wang C, Fagotto F. Regulation of the phosphorylation and nuclear import and export of β -catenin by APC and its cancer-related truncated form. *Journal of cell science* . 2014 Apr 15;127(Pt 8):1647–59.
 18. Kypta RM, Waxman J. Wnt/ β -catenin signalling in prostate cancer. *Nature reviews Urology* . Nature Publishing Group; 2012 Aug 19;9(8):418–28.
 19. Fonseca-Alves CE, Kobayashi PE, Rivera-Calderón LG, Laufer-Amorim R. Evidence of epithelial–mesenchymal transition in canine prostate cancer metastasis. *Research in Veterinary Science*. Elsevier Ltd; 2015 Jun;100:176–81.
 20. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, β -catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* . 2009 Jun 20;28(1-2):151–66.
 21. Fonseca-Alves CE, Rodrigues MMP, de Moura VMDB, Rogatto SR, Laufer-Amorim R. Alterations of C-MYC, NKX3.1, and E-cadherin expression in canine prostate carcinogenesis. *Microscopy Research and Technique* . 2013 Dec;76(12):1250–6.
 22. Rodrigues MMP, Rema A, Gartner MF, Laufer-Amorim R. Role of Adhesion Molecules and Proliferation Hyperplasic, Pre Neoplastic and

- Neoplastic Lesions in Canine Prostate. *Pakistan Journal of Biological Sciences* [Internet]. 2013 Dec 1;16(21):1324–9.
23. Smith J. Canine prostatic disease: A review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. *Theriogenology*. 2008;70:375–83.
 24. L'Eplattenier HF. Studies on the Pathogenesis and Management of Prostate Carcinoma in Dogs H. F. L'Eplattenier. 2009.
 25. Dorso L, Chanut F, Howroyd P, Burnett R. Variability in weight and histological appearance of the prostate of beagle dogs used in toxicology studies. *Toxicologic pathology*. 2008;36:917–25.
 26. Fonseca-Alves CE, Faleiro MBR, Amorim RL, De Moura VMDB. Avaliação histológica da próstata de cães adultos sexualmente intactos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2010 Jun;62(3):596–602.
 27. De Marzo AM, Platz E a, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* . 2007 Apr;7(4):256–69.
 28. De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schröder F, et al. The Controversial Relationship Between Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer: The Role of Inflammation. *European Urology*. 2011 Jul;60(1):106–17.
 29. Omabe M, Ezeani M. Infection, inflammation and prostate carcinogenesis. *Infection, Genetics and Evolution* . Elsevier B.V.; 2011 Aug;11(6):1195–8.
 30. Rossignol a, Villers A, Molinié V, Mazerolles C. Histologie et immunohistochimie de la prostate du chien . Validité du modèle animal pour l ' étude des lésions précancéreuses. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 2004;1(155):21–6.
 31. Galvão ALB, Ferreira GS, Léga E., Costa PF, Ondani AC, Denicol A. Principais afecções da glândula prostática em cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2011;35(4):456–66.
 32. LeRoy BE, Nadella MVP, Toribio RE, Leav I, Rosol TJ. Canine prostate carcinomas express markers of urothelial and prostatic differentiation. *Veterinary pathology* . 2004 Mar 1;41(2):131–40.
 33. Matsuzaki P, Cogliati B, Sanches DS, Chaible LM, Kimura KC, Silva TC, et al. Immunohistochemical Characterization of Canine Prostatic

- Intraepithelial Neoplasia. *Journal of Comparative Pathology* . Elsevier Ltd; 2010 Jan;142(1):84–8.
34. Baetke SC, Adriaens ME, Seigneuric R, Evelo CT, Eijssen LMT. Molecular Pathways Involved in Prostate Carcinogenesis: Insights from Public Microarray Datasets. de Wever O, editor. *PLoS ONE* . 2012 Nov 20;7(11):e49831.
 35. Palapattu GS. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis* . 2004 Oct 21;26(7):1170–81.
 36. Grover PL, Martin FL. The initiation of breast and prostate cancer. *Carcinogenesis*. 2002;23(0143-3334):1095–102.
 37. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & Development*. 2010 Sep 15;24(18):1967–2000.
 38. Alshenawy HA, Ali MAE-HAE-A. Differential caveolin-1 expression in colon carcinoma and its relation to E-cadherin– β -catenin complex. *Annals of Diagnostic Pathology*. Elsevier Inc.; 2013 Dec;17(6):476–82.
 39. Chen G, Shukeir N, Potti A, Sircar K, Aprikian A, Goltzman D, et al. Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer [Internet]*. 2004 Sep 15;101(6):1345–56.
 40. López-Knowles E, Zardawi SJ, McNeil CM, Millar EK , Crea P, Musgrove E, et al. Cytoplasmic localization of beta-catenin is a marker of poor outcome in breast cancer patients. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology [Internet]*. 2010 Jan 1;19(1):301–9.
 41. Morgan C, Jenkins S a., Kynaston HG, Doak SH. The role of adhesion molecules as biomarkers for the aggressive prostate cancer phenotype. André F, editor. *PLoS ONE [Internet]*. 2013 Dec 16;8(12):1–8.
 42. Drivalos A, Papatsoris AG, Chrisofos M, Efstathiou E, Dimopoulos M a. The role of the cell adhesion molecules (integrins/cadherins) in prostate cancer. *International braz j urol: official journal of the Brazilian Society of Urology [Internet]*. 2011 Jun;37(3):302–6.
 43. Rodrigues MMP, Rema A, Gartner MF, Laufer-Amo R. Role of Adhesion

- Molecules and Proliferation Hyperplasic, Pre Neoplastic and Neoplastic Lesions in Canine Prostate. *Pakistan Journal of Biological Sciences* [Internet]. 2013 Dec 1;16(21):1324–9.
44. Kim H, He Y, Yang I, Zeng Y, Kim Y, Seo YW, et al. δ -Catenin promotes E-cadherin processing and activates β -catenin-mediated signaling: Implications on human prostate cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* [Internet]. 2012 Apr;1822(4):509–21.
 45. Jaggi M, Johansson SL, Baker JJ, Smith LM, Galich A, Balaji KC. Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer☆ *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2005 Nov;23(6):402–6.
 46. Faleiro-Rodrigues C, Macedo-Pinto I, Pereira D, Lopes CS. Prognostic value of E-cadherin immunoexpression in patients with primary ovarian carcinomas. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* [Internet]. 2004 Oct 1;15(10):1535–42.
 47. Rubin M a, Mucci NR, Figurski J, Fecko a, Pienta KJ, Day ML. E-cadherin expression in prostate cancer: a broad survey using high-density tissue microarray technology. *Human pathology*. 2001 Jul;32(7):690–7.
 48. Cervantes-Arias A, Pang LY, Argyle DJ. Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental mechanism underlying the cancer phenotype. *Veterinary and Comparative Oncology*. 2013 Sep;11(3):169–84.
 49. Polakis P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1997 Jun;1332(3):F127–47.
 50. Bruxvoort KJ, Charbonneau HM, Giambernardi T a., Goolsby JC, Qian CN, Zylstra CR, et al. Inactivation of Apc in the mouse prostate causes prostate carcinoma. *Cancer Research*. 2007;67:2490–6.
 51. Watanabe M, Kakiuchi H, Kato H, Shiraishi T, Yatani R, Sugimura T, et al. APC gene mutations in human prostate cancer. *Japanese journal of clinical oncology*. 1996 Apr;26(2):77–81.
 52. Richiardi L, Fiano V, Grasso C, Zugna D, Delsedime L, Gillio-Tos A, et al. Methylation of APC and GSTP1 in non-neoplastic tissue adjacent to prostate tumour and mortality from prostate cancer. Yu J, editor. *PLoS*

- one. 2013 Jul 9;8(7):e68162.
53. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell*. 2009 Jul;17(1):9–26.
 54. Valkenburg KC, Yu X, De Marzo AM, Spiering TJ, Matusik RJ, Williams BO. Activation of Wnt/ β -catenin signaling in a subpopulation of murine prostate luminal epithelial cells induces high grade prostate intraepithelial neoplasia. *The Prostate*. 2014 Nov;74(15):1506–20.
 55. Kawano Y. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of cell science*. 2003 Jul 1;116(Pt 13):2627–34.
 56. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2012 Dec 21;13(1):11–26.
 57. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 2012 Jun;149(6):1192–205.
 58. Lean FZX, Kontos S, Palmieri C. ScienceDirect Expression of b -catenin and Mesenchymal Markers in Canine Prostatic Hyperplasia and Carcinoma. *Journal of Comparative Pathology*. Elsevier Ltd; 2014;150(4):373–81.
 59. Simons BW, Hurley PJ, Huang Z, Ross AE, Miller R, Marchionni L, et al. Wnt signaling though beta-catenin is required for prostate lineage specification. *Developmental biology*. Elsevier; 2012 Nov;371(2):246–55.

Normas da revista Veterinária e Zootecnia:

• Artigos de Revisão Bibliográfica

Os artigos de revisão bibliográfica serão publicados nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, quando o autor apresentar contribuição científica, relevante na área específica do assunto abordado, a convite dos editores.

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com keywords e resumen com palabras claves, introdução, desenvolvimento do assunto, conclusão e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas e 60 referências.

• Relato de Caso

Não devem ser estruturados, como os artigos. Devem apresentar o título em português, em inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com keywords, resumen com palabras claves e referências. Devem conter no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

• Comunicações Curtas

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas com, no máximo, cinco páginas, uma tabela e 10 referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

• Referências e Citações

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

Exemplos

Citações

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa(1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

Referências

Indique somente até seis autores. Em caso de mais autores, usar et al. após o sexto autor.

1. Artigo de revista

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2. Organização como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3. Livro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4. Capítulo de livro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilocócias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. *Produção de frangos de corte*. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

5. Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: *Anais do 3º Congresso Nordestino de Produção Animal*; 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3

6. Teses, dissertações e outros trabalhos acadêmicos

Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

7. Publicações disponíveis na Internet

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: .

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".
2. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, com numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página.
3. URLs para as referências foram informadas quando necessário.
4. O texto está em espaço simples; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL); as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento, como anexos.
5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em [Diretrizes para Autores](#), na seção Sobre a Revista.
6. A identificação de autoria do trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, conforme instruções disponíveis em [Assegurando a Avaliação Cega por Pares](#). O nome dos autores e suas filiações estão devidamente preenchidos em "metadados".

Declaração de Direito Autoral

Pelo presente instrumento, concedemos os direitos autorais referente ao trabalho submetido para a possível publicação na Revista "Veterinária e Zootecnia", da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP - Botucatu - SP.

By agreeing with the terms presented here, the authors grant the rights regarding the submitted article for possible publication in the journal "Veterinária e Zootecnia", property of the School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP-Botucatu, SP.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

ISSN: 2178-3764

Trabalho a ser enviado para a revista *Veterinary and Comparative Oncology* .

**APC, E-cadherin, β -catenin and Caveolin-1 Expression in canine prostate
carcinogenic and metastatic process**

Priscila E Kobayashi¹, Carlos E Fonseca-Alves¹, Luis G Rivera-Calderón²,
Márcio Carvalho¹, Hellen Kuasne³, Silvia R Rogatto^{3,4}, Renée Laufer-Amorim¹

¹Department of Veterinary Clinic, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Univ. Estadual Paulista – UNESP, Botucatu-SP, Brazil

²Department of Veterinary Pathology, School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Univ. Estadual Paulista- UNESP, Jaboticabal-SP, Brazil

³International Center for Research (CIPE), AC Camargo Hospital, Liberdade, Sao Paulo, Brazil

⁴ Department of Urology, Botucatu Medical School – FMB, Univ. Estadual Paulista – UNESP, Botucatu-SP, Brazil.

Corresponding Author:

Renée Laufer-Amorim

Department of Veterinary Clinic

School of Veterinary Medicine and Animal Science

Univ. Estadual Paulista

Adress: Distrito de Rubião Jr. s/n

Postal code: 18618-970

Phone: (5514) 38802066

E-mail: renee@fmvz.unesp.br

ABSTRACT

This research aimed to evaluate APC, E-cadherin, β -catenin and Caveolin-1 expression by RT-qPCR and immunohistochemistry and the methylation status of APC gene in pre neoplastic, neoplastic and metastasis of canine prostate. Membranous protein expression of E-cadherin and β -catenin was observed in normal prostates samples and downexpression was observed in PIA, PC and metastasis. We identified cytoplasmic acumulation of β -catenin, but interestingly, only two sample showed nuclear expression (2/10). Different from humans, we did not found APC downexpression and there was no hipermethylation in the APC gene promoter. The absence of APC alterations could prevent the β -catenin translocation to the nucleus. Caveolin-1 gene and protein expression were overexpressed in canine Prostate cancer (PC) and metastasis. These results suggest a multifactorial process in the carcinogenic process and metastasis of canine prostate, indicating dogs as a good model to the human PC study, although we observe some differences, such as lack of APC methylation and no translocation of β -catenin to the nucleus.

Keywords: WNT pathway, dogs, oncology, metastasis

INTRODUCTION

Prostate cancer (PC) is a disease with complex and multifactorial processes (KELLER et al., 2013) associated with increased incidence rates in humans (EMAMI; COREY, 2007). In 2016, 180,890 new cases and 26,120 prostate cancer-related deaths are expected only in the United States (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015). Several studies addressing molecular markers and carcinogenic pathways studies provide clinical, diagnostic and therapeutic informations, and may even predict cancer progression in early-stage (YANG et al., 2012). However, studies are needed in order to better understand the prostatic carcinogenesis, including the molecular mechanisms underlying the development of hormone resistant tumors (WINKLER et al., 2007).

WNT/ β -Catenin is widely studied in human oncology and less explored in canine tumors. It is an important regulator of embryogenesis and pathogenesis of multiple tumors types (KYPTA; WAXMAN, 2012)(VERRAS; SUN, 2006)(YU et al., 2009). Deregulation of this pathway leads to the transcriptional activation of target genes (JAMIESON; SHARMA; HENDERSON, 2012) and may cause hereditary syndromes and sporadic cancers, including prostate cancers (LI et al., 2012). Regulation of canonical WNT pathway involves β -catenin destruction complex, a key mediator of WNT signaling in the nucleus (YU et al., 2009) (LI et al., 2012). Degradation of cytosolic β -catenin occurs by the destruction complex constituted by APC (*Adenomatous polyposis coli*) and other proteins, preventing β -catenin accumulation (YU et al., 2009)(STAMOS; WEIS, 2013). APC is possibly correlated with β -catenin degradation inhibition (WANG et al., 2014), and downregulation of APC mediated by methylation has been widely studied as epigenetic alteration in human prostate cancer and associated with high mortality rates (RICHIARDI et al., 2009).

E-cadherin/ β -catenin complex is an essential component in the cell adhesion complex and is also important for prostate gland formation and function (KYPTA; WAXMAN, 2012). Absence of E-cadherin and β -catenin expression in cell membrane is associated with tumor invasion into surrounding tissues and metastatic process in dogs (FONSECA-ALVES et al., 2015) and humans (SCHMALHOFER; BRABLETZ; BRABLETZ, 2009). In dogs, E-

cadherin shows a dynamic expression during prostate cancer development (FONSECA-ALVES et al., 2013), even in preneoplastic lesions, with loss of membranous expression when compared to normal and hyperplasic prostates (RODRIGUES et al., 2013a).

Caveolin-1 (CAV-1) belongs to the family of membrane proteins called caveolins, the main structural components of caveolae, which are present in plasma membrane and has been implied in cellular signaling, transport, cell adhesion and mechanotransduction (YANG et al., 2005) (QUEST et al., 2013) (NASSAR et al., 2013). CAV-1 plays important roles in carcinogenesis, regulating cell proliferation (GUMULEC et al., 2012), PI3-K-AKT pathway signaling and AKT target genes involved in inhibiting apoptosis, responsible for enhanced cell survival (YANG et al., 2012), contributing to metastatic process (YANG et al., 2005).

However, there are no studies evaluating CAV-1 and APC proteins in normal prostates, proliferative inflammatory atrophy (PIA), PC and metastasis in dogs, nor relating it to β -catenin and E-cadherin proteins and their genes. Due to importance of canine PC characterization, this study aimed to evaluate CAV-1, APC, E-cadherin and β -catenin gene and protein expressions by RT-qPCR and immunohistochemistry and evaluate epigenetic alteration in APC gene by pyrosequencing.

MATERIALS AND METHODS

Samples

One hundred prostatic tissues were drawn from the Veterinary Pathology Service, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brazil, comprising 34 canine prostate for immunohistochemistry (IHC), 42 canine prostates for RT-qPCR and 24 canine prostate for pyrosequencing analysis. For the IHC and RT-qPCR, normal prostate and PIA were collected from animals without clinical history, at necropsy, until one hour post mortem. PC cases used in immunohistochemistry and RT-qPCR analysis, specimens were represented by biopsies (n=7), prostate collected at necropsy with previous confirmed diagnostic (n=1) and prostates collected at necropsy from animals with clinical history of prostate lesions (n=2). In addition to the nine mentioned samples, for

RT-qPCR seven more PC samples collected at necropsy without clinical history of PC were used.

Samples for immunohistochemistry and RT-qPCR were fixed in 10% buffered formalin during 24 hours, transferred to a 70% alcohol solution until routinely processed in an alcohol-xylene series and embedded in paraffin. Then 3µm histological sections were cut and stained with haematoxylin and eosin (HE) for histopathological diagnosis, made by two pathologists (PEK and CEFA) in an optical microscopy, according to PALMIERI et al., 2014. Gleason Grade score was accessed according to PALMIERI; GRIECO (2015).

For methylation analysis, fresh samples were collected and frozen by immersing in liquid nitrogen and after stored at -80° C. Histopathological diagnosis was made in cryostat sections, stained with haematoxylin and eosin (HE).

After histopathological classification, 10 normal prostates, 10 PIA, 10 PC and 4 metastasis were selected for IHC (table 1); 11 normal prostates, 11 PIA, 17 PC and 3 metastasis were selected for RT-qPCR and 6 normal prostates, 6 PIA and 12 PC for methylation analysis.

Real time quantitative PCR (RT-qPCR)

For RNA extraction 42 formalin-fixed paraffin-embedded prostate samples (11 normal prostate, 11 PIA, 17 PC, 3 metastasis) were used. The areas of interest were marked in H&E slide for reference, and we performed needle-macrodissected (needle 16G) and transferred to a sterile 1.5ml tube. Then, the deparaffinization steps, protease digestion and total nucleic acid extraction were done with a commercial RecoverAll™ Total Nucleic Acid kit (Ambion, Life Technologies, MA, USA), according to the manufacturer's instructions.

Spectrophotometric analysis was used to access RNA concentration (NanoDrop™, ND-8000, Thermo Scientific, MA, USA) and RNA integrity was evaluated by Bioanalyzer 2100 and Agilent RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, CA, USA).

cDNA synthesis was performed using 1 µg of total RNA treated with DNase I (Life Technologies, Rockville, MD, USA), 200 U of *SuperScript* III Reverse Transcriptase enzyme (Life Technologies), 4 µL of *SuperScript* First-

Strand Buffer 5X, 1 μ L of dNTP 10 mM each (Life Technologies), 1 μ L of Oligo-(dT)₁₈ (500 ng/ μ L) (Life Technologies), 1 μ L of random hexamers (100 ng/ μ L) (Life Technologies), and 1 μ L of DTT 0.1 M (Life Technologies) in a final volume of 20 μ L. Reverse transcription was carried out at 50°C for 60 min and then inactivated at 70°C for 15 min. cDNA samples were stored at -80°C.

RT-qPCR reactions for *APC*, *CAV-1*, *CDH1*, *β -catenin* and reference gene (table 2) were performed in QuantStudio 12k Flex Thermal Cycler equipment (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA). All reactions were performed in triplicate with 384-well plates, with a total volume of 10 μ L containing Power SYBR Green PCR Master Mix, (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA), 1 μ L cDNA (1:10) and 0.3 μ L of each primer.

A dissociation curve analysis was included in all experiments to determine PCR product specificity. The most stable reference gene (*HPRT*) was determined by geNorm software from a group of three genes (*GAPH*, *HPRT*, and *RPL8*). Gene relative quantification was calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Immunohistochemistry (IHC)

Prostate paraffin sections of 3 μ m were cut with a microtome (Leica 2155), placed on charged slides (Starfrost) and deparaffinized. For E-cadherin and *β -catenin* antibodies, the slides were subjected to antigen retrieval in citrate buffer, pH 6.0, in a pressure cooker (Pascal; Dako, Carpinteria, CA, USA), for *CAV-1* antibody the antigen retrieval was performed in citrate buffer, pH6.0, in a microwave for 5 minutes and for *APC* antibody, Tris EDTA pH 9.0 in a pressure cooker (Pascal; Dako, Carpinteria, CA, USA). Endogenous peroxidase activity and non-specific bindings were blocked using, 8% hydrogen peroxide in methanol for 20 min and 8% skin milk for 60 min, both at 27°C, respectively. Primary antibodies, dilutions as well as incubation time used are represented in table 3. A polymer detection system (Envision, Dako) was applied as the secondary antibody and reactions were developed with the use of 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Sections were counterstained with Harris haematoxylin. Positive and negative controls were performed for all antibodies, using normal canine prostate for positive controls and for negative, the primary antibody was replaced by Tris buffer.

IHC staining was evaluated by quantitative analysis using NIH ImageJ 1.49v software for analysis. Staining was assessed by setting a threshold, where all stained areas were selected, then these selected areas and pixel counts were calculated automatically by the software in each microscopic field, and reported as the total density. This total density value was divided by the total image area and related this as percent area. Besides, the mean total density from normal prostates, for each primary antibody was calculated to established a cutoff value for high and low protein expression. Thus, percent areas values that were above the mean were considered as high protein expression and below the mean, were considered low.

DNA extraction and pyrosequencing methylation analysis

Total DNA was extracted from frozen prostates using Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit, following the manufactures protocol. Frozen tissue were cut into small pieces with a scalpel blade, homogenised with Precellys® to facilitate digestion with proteinase K, and maintained during 2 hours at 56°C. DNA concentration was measured by NanoDrop®.

For pyrosequencing reactions, APC CpGs islands were identified using the website BLAT Search Genome (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>), and PCR and sequencing primers were designed (table 4).

After bisulfite treatment with EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo research), unmethylated cytosine residues were converted into uracil and then, PCR process was made following the temperature conditions: melting temperature: 50.1°C, denaturation temperature: 94°C, hybridization: 45°C, extension: 72°C. PCR protocol was made with Taq DNA Polymerase and PCR buffer solutions with Mg²⁺. The reaction was performed in thermocycler and repeated for 50 times.

For performing pyrosequencing reactions, samples were prepared with PyroMark Gold Q96 Reagents (5X95) reagents, according to manufacture's instructions.

Statistical analysis

One way ANOVA was used to compare protein expression among different groups of lesions, followed by comparisons between two groups of different lesion using t-test.

APC, *CAV-1*, *CDH1* and *β-catenin* transcription levels were analysed by Kruskal-Wallis or Mann-Whitney U tests, comparing groups. Statistical analysis and graphics were obtained using GraphPad Prism 5.0. *P* values of <0.05 were considered to be *statistically* significant.

RESULTS

Patient data

From the 10 animals with PC, that were used to both gene and protein expression, we had clinical information from nine of them (table 5). The mean age of the dogs (n=9) with PC was 11.3 years and all of them were more than 8 years old. All 9 animals were intact males. The most frequent clinical manifestations were hematuria (3/9). Only one patient presented lameness due to lumbar vertebrae and pelvic metastasis and euthanasia was performed due to PC complications. We identified eight different breeds in our study. Mixed breed dogs were the most prevalent (3/9), followed by German Shepherd (1/9), American Pit Bull Terrier (1/9), English Cocker Spaniel (1/9), Scottish Terrier (1/9), Dachshund (1/9) and Boxer (1/9).

Histopathology

From the 10 PC used to IHQ, seven (70% - 7/10) were characterized by mixed histological pattern and among them, five had a cribriform pattern associated (table 1). Concerning metastatic samples, the PC lymph node and metastasis in pelvic area presented cribriform with comedonecrosis pattern, pulmonary metastasis presented small acinar/ductal pattern and intestinal metastasis presented cribriform with comedonecrosis with foci of small acinar/ductal pattern (Supplementary figure 1)

The Gleason grading system (table 1) revealed 4 samples with Gleason score 10, followed by score 9 (n=3/10), score 6 (n=2/10) and score 8 (n=1/10).

RT-qPCR

The mean value of RQ for *APC* gene was 1.35 in normal prostate, 0.54 in PIA, 2.78 in PC and 0.55 in metastasis, with tendency *APC* overexpression in PC samples (Figure 2A). No statistical difference was found among the groups.

The relative expression levels of β -catenin in PIA (mean=5.74) and PC (mean= 1.78) had a tendency to be higher than normal prostates (mean=0,85) (Figure 2C).

We observe low *CDH1* transcript levels in PIA samples compared to normal samples ($P<0,05$). No difference between the transcript levels of *CDH1* in PC samples compared to normal samples was observed. However, it is possible to note an increased expression in metastasis group (Figure 2E).

CAV-1 expresion had an increase in PIA (mean=1.09) and PC (mean= 2.15), and a decrease in metastasis (mean= 0.67), with no statistical difference observed (Figure 2G), compared to normal prostate.

Immunohistochemistry (IHC)

The mean percent area of positive cells for each antibody and standard deviation are represented in table 6.

APC in normal prostate samples showed cytoplasmic staining (Figure 1B) with a higher density area than all primary antibodies. Lower *APC* expression was found in PIA compared to normal prostates ($P=0.0007$). Lower cytoplasmic *APC* expression was observed in 6 PC (Figure 1F) in comparison with normal prostate, although it was not statistically significant. Nuclear staining was observed in five PC (5/10 samples) and one metastasis (1/4 samples) (Figure 1J).

E-cadherin (Figure 1C) and β -catenin (Figura 1D) membranous staining was observed in all normal prostate epithelial cells. Significant reduction of membranous staining was found in PIA compared to normal ($P<0,05$) for both proteins, and significant loss ($P<0,05$) of membranous β -catenin expression was observed in PC (Figure 1H). Nuclear expression of β -catenin was observed in two PC and one metastasis (Figure 1L). Five PC samples (5/10) and two metastasis (2/3) showed translocation of E-cadherin from membrane to cytoplasm (Figure 1G and 1K).

Epithelial cells from normal prostate showed CAV-1 cytoplasmic staining (Figure 1A) with a low- density area of expression. Epithelial cells in PIA group showed increased cytoplasmic staining and 80% of cases had higher CAV-1 expression (above the cut off value from normal prostates). PC (Figure 1 E) and metastasis (Figure 1I) exhibited CAV-1 overexpression, both with statistical difference compared to normal ($P<0,05$). Furthermore, CAV-1 expression showed a relation with Gleason score. Two PC samples with the lowest CAV-1 density area had the lowest Gleason score (cases number 25 and 30s) .

Immunohistochemistry revealed significant differences ($P<0,05$) in APC (Figure 2B), CAV-1 (Figure 2H), E-cadherin (Figure 2F) and β -catenin (Figure 2D) expression when compared normal prostates, PIA, PC and metastasis.

Pyrosequencing methylation analysis

Pyrosequencing analysis revealed that the promoter region of *APC* gene (figure 3) was unmethylated in PC samples.

DISCUSSION

The high prevalence of PC in men and dogs, their spontaneous development and clinical similarities make the dog an interesting model to study the development of prostatic alterations (RODRIGUES et al., 2011). The mean age at prostate cancer diagnosis in this study, was 11.3, similar to the 10 years reported before (CORNELL et al., 2000)(SHAFIEE et al., 2015)(TESKE et al., 2002), and almost similar to the mean age of 70 years in humans (WATERS et al., 1996). No breed predisposition was found as other reports.

Our results showed the importance of CAV-1, APC, E-cadherin and β – catenin in the prostatic carcinogenic and metastatic process in dogs, as in humans.

Hypermethylation of *APC* CpG island was not observed in canine PC, different from humans. Although there was no statistical difference in *APC* expression, a tendency arose to to a higher RQ in PC than the normal prostate, as well as an increase in APC levels in PC expression, with nuclear translocation of the protein. APC showed cytoplasmic expression in PC and metastasis samples. Nuclear expression was seen in four PC and all of them had cribriform pattern, as a single or mixed histological pattern. These findings

corroborate studies about APC role in carcinogenesis and metastasis, but differ from human carcinoma prostate, since APC gene is hypermethylated in a prevalence greater than 50% of PC (RICHIARDI et al., 2009), consequently low protein expression are found in human neoplastic cells.

A diffuse cytoplasmic β -catenin pattern was observed in five PIA, all PC and metastasis samples, demonstrating an important role in tumor progression and the importance PIA as a pre neoplastic lesion in canine prostate carcinogenesis. Moreover, nucleus expression was only observed in PC samples, emphasizing the importance of β -catenin protein in tumorigenesis (VERRAS; SUN, 2006). Different from humans, few samples showed β -catenin translocation to the nucleus. This result can be explained due to absence of APC alterations in canine PC. We hypothesized that cytoplasmic APC is binding with cytoplasmic β -catenin preventing their translocation to the nucleus. Interestingly, five samples (4 PC and 1 metastasis) showed nuclear APC and these samples did not express nuclear β -catenin.

β -catenin gene expression had a tendency to be overexpressed in PIA when compared to normal prostate. Nevertheless, protein expression had a tendency to decrease in these same samples. These results could be explained by presence of β -catenin reported in regulatory T cells (DING et al., 2008) and inflammatory cells around the glands, contributing to gene expression values. Nonetheless, in IHC, only epithelial cells were analyzed. Thus, the difference can be a consequence of the methodology, an alteration in protein half life or post transcriptional regulation of this gene (SALIC et al., 2000)

Two prostate cancer samples had nuclear β -catenin, one sample showed E-cadherin protein expression below the mean, indicating a connection loss of membranous E-cadherin/ β -catenin in prostate cancer and metastasis, ensuring availability of β -catenin for nuclear translocation. In addition, case APC protein expression was below the average, suggesting a molecular role of cytoplasmic APC in β -catenin destruction. The other prostate cancer sample exhibit APC protein expression above the average and nuclear staining, which could lead to nuclear β -catenin accumulation. High Gleason grade (10) was found in both PC samples with nuclear β -catenin expression and only samples with Gleason grade 10 had β -catenin membranous loss and gain of cytoplasmic and/or nuclear staining, similar to human data where membranous loss was found in

high grade Gleason score (CHEN et al., 2004). In humans, only 20% of advanced prostate tumors are associated with nuclear β -catenin (VALKENBURG et al., 2014), similar with our findings.

Membranous E-cadherin and β -catenin expression play an important role in cell-cell adhesion. Loss of expression is a prerequisite for invasion and metastasis of neoplastic cells (SCHMALHOFER; BRABLETZ; BRABLETZ, 2009), besides its central role in epithelial- mesenchymal transition in canine prostate cancer (FONSECA-ALVES et al., 2015). Membranous underexpression E-cadherin observed in PC samples was higher in solid pattern areas when compared to adjacent patterns: cribriform and small acinar/ductal. Our findings are consistent with the hypothesis that loss of E-cadherin expression is a dynamic change during cell dedifferentiation permitting tumor cells be able to migrate through stroma, vessels and other tissues (FONSECA-ALVES et al., 2015)(YOUNIS; EL SAKKA; HAQUE, 2007).

Statistical difference was observed in E-cadherin expression among the groups, similar to Fonseca- Alves et al. (2013), with a discrete increase in gene and protein expression in prostate cancer. Despite the loss of membranous staining, this discrete increase in E-cadherin expression possibly correlates with cytoplasmic pattern found in PC samples, also found in gastric cancer (RAMESH; NASH; MCCULLOCH, 1999). Although there was no statistical difference, metastatic cells had lower E-cadherin and β -catenin expression than primary tumors, this could be related to EMT process, important for metastasis in all epithelia cancer.

Studies reported E-cadherin cytoplasmic pattern in human prostate cancer, by an uncoordinated protein production, and likely because an inactivated protein (LIU et al., 2014).

PIA, associated inflammatory process, showed loss of E-cadherin gene and protein expression. This may occur because *CDH-1* (E-cadherin) is downregulated by a regulatory cytokine: transforming growth factor beta (TGF- β), decreasing E-cadherin expression (LIU et al., 2014). TGF- β is a secreted protein released by several immune cells in the tumor microenvironment (FUXE; KARLSSON, 2012). PIA is an excellent example of inflammation contributing to cancer process. In a previous work from our group, Rodrigues et

al.(2010) found of TGF- β up regulation in PIA, so this may be a mechanism for E-cadherin down expression.

CAV-1 is a membrane protein generally considered as a tumor progression marker and a target to cancer therapy (KLEIN et al., 2015). The results of this work showed tendency of a progressive increase of CAV-1 gene and protein expressions in PIA, followed by PC samples, when compared to normal prostate. This increased expression was not observed in metastasis maybe due to the small number of samples. Immunohistochemistry analysis revealed granular cytoplasmic staining, and PC with lower Gleason grades (grade 6) showed a decreased protein expression. In humans, CAV-1 expression is positively correlated with high-grade Gleason score (KARAM et al., 2007), early recurrence time and therapeutic resistance (KUO et al., 2012; QUEST et al., 2013).

CONCLUSIONS

We have shown that APC can contribute in the destruction of cytoplasmic β -catenin, preventing their translocation to the nucleus. Therefore, further studies are required to elucidate different mechanisms of regulation of this gene in canine prostate. Canine PC was correlated with loss of membranous E-cadherin in primary tumors and higher membranous/cytoplasmic expression in their metastasis. CAV-1 expression levels in canine prostate cancer can be linked to higher Gleason score, similar to human data.

ACKNOWLEDGEMENTS

CNPq (443884/2014-5), CNPq (131323/2014-8), FAPESP.

REFERENCES

- AKTER, S. H. et al. Different Growth Patterns of Canine Prostatic Carcinoma Suggests Different Models of Tumor-Initiating Cells. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 6, p. 1027–1033, 1 nov. 2015.
- ALSHENAWY, H. A.; ALI, M. A. E.-H. A. E.-A. Differential caveolin-1 expression in colon carcinoma and its relation to E-cadherin– β -catenin complex. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 17, n. 6, p. 476–482, dez. 2013.
- ANASTAS, J. N.; MOON, R. T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 1, p. 11–26, 21 dez. 2012.
- BAETKE, S. C. et al. Molecular Pathways Involved in Prostate Carcinogenesis: Insights from Public Microarray Datasets. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49831, 20 nov. 2012.
- BJERKE, G. A et al. Prostate cancer induced by loss of Apc is restrained by TGF β signaling. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92800, 20 mar. 2014.
- BRUXVOORT, K. J. et al. Inactivation of Apc in the mouse prostate causes prostate carcinoma. **Cancer Research**, v. 67, p. 2490–2496, 2007.
- CERVANTES-ARIAS, A.; PANG, L. Y.; ARGYLE, D. J. Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental mechanism underlying the cancer phenotype. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 11, n. 3, p. 169–184, set. 2013.
- CHAW, S. Y. et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers – E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin – in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. **Oral Oncology**, v. 48, n. 10, p. 997–1006, out. 2012.
- CHEN, G. et al. Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. **Cancer**, v. 101, n. 6, p. 1345–56, 15 set. 2004.
- CHIAM, K.; RICCIARDELLI, C.; BIANCO-MIOTTO, T. Epigenetic biomarkers in prostate cancer: Current and future uses. **Cancer letters**, v. 342, n. 2, p. 248–56, 28 jan. 2014.
- CLEVERS, H.; NUSSE, R. Wnt/??-catenin signaling and disease. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1192–1205, jun. 2012.
- CORNELL, K. K. et al. Clinical and pathologic aspects of spontaneous canine prostate carcinoma: A retrospective analysis of 76 cases. **The Prostate**, v. 45, n. 2, p. 173–183, 1 out. 2000.

DE MARZO, A. M. et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256–269, abr. 2007.

DE NUNZIO, C. et al. The Controversial Relationship Between Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer: The Role of Inflammation. **European Urology**, v. 60, n. 1, p. 106–117, jul. 2011.

DING, Y. et al. Beta-catenin stabilization extends regulatory T cell survival and induces anergy in nonregulatory T cells. **Nature medicine**, v. 14, n. 2, p. 162–9, 3 fev. 2008.

DORSO, L. et al. Variability in weight and histological appearance of the prostate of beagle dogs used in toxicology studies. **Toxicologic pathology**, v. 36, p. 917–925, 2008.

DRIVALOS, A. et al. The role of the cell adhesion molecules (integrins/cadherins) in prostate cancer. **International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology**, v. 37, n. 3, p. 302–6, jun. 2011.

EMAMI, K. H.; COREY, E. When prostate cancer meets bone: Control by wnts. **Cancer Letters**, v. 253, n. 2, p. 170–179, ago. 2007.

FALEIRO-RODRIGUES, C. et al. Prognostic value of E-cadherin immunoexpression in patients with primary ovarian carcinomas. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 15, n. 10, p. 1535–42, 1 out. 2004.

FODDE, R.; TOMLINSON, I. Nuclear beta-catenin expression and Wnt signalling: in defence of the dogma. **The Journal of pathology**, v. 221, n. 3, p. 239–41, jul. 2010.

FONSECA-ALVES, C. E. et al. Avaliação histológica da próstata de cães adultos sexualmente intactos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 596–602, jun. 2010.

FONSECA-ALVES, C. E. et al. Alterations of C-MYC, NKX3.1, and E-cadherin expression in canine prostate carcinogenesis. **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 12, p. 1250–1256, dez. 2013.

FONSECA-ALVES, C. E. et al. Evidence of epithelial–mesenchymal transition in canine prostate cancer metastasis. **Research in Veterinary Science**, v. 100, p. 176–181, jun. 2015.

FUXE, J.; KARLSSON, M. C. I. TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition: a link between cancer and inflammation. **Seminars in cancer**

biology, v. 22, n. 5-6, p. 455–61, out. 2012.

GALVÃO, A. L. B. et al. Principais afecções da glândula prostática em cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 456–466, 2011.

GROVER, P. L.; MARTIN, F. L. The initiation of breast and prostate cancer. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 0143-3334, p. 1095–1102, 2002.

GUMULEC, J. et al. Caveolin-1 as a potential high-risk prostate cancer biomarker. **Oncology reports**, v. 27, n. 3, p. 831–41, 8 mar. 2012.

HENSEL, J.; THALMANN, G. N. Biology of Bone Metastases in Prostate Cancer. **Urology**, jan. 2016.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.]. v. 1

JAGGI, M. et al. Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer☆. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 23, n. 6, p. 402–406, nov. 2005.

JAMIESON, C.; SHARMA, M.; HENDERSON, B. R. Wnt signaling from membrane to nucleus: β -catenin caught in a loop. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 44, n. 6, p. 847–50, jun. 2012.

JOHNSTON, S. . et al. Prostatic disorders in the dog. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 405–415, jul. 2000.

KARAM, J. A. et al. Caveolin-1 overexpression is associated with aggressive prostate cancer recurrence. **The Prostate**, v. 67, n. 6, p. 614–22, 1 maio 2007.

KAWANO, Y. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. **Journal of cell science**, v. 116, n. Pt 13, p. 2627–2634, 1 jul. 2003.

KELLER, J. M. et al. A novel canine model for prostate cancer. **The Prostate**, v. 73, n. 9, p. 952–959, jun. 2013.

KIM, H. et al. δ -Catenin promotes E-cadherin processing and activates β -catenin-mediated signaling: Implications on human prostate cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 4, p. 509–521, abr. 2012.

KLEIN, D. et al. Endothelial Caveolin-1 regulates the radiation response of epithelial prostate tumors. **Oncogenesis**, v. 4, n. 5, p. e148, 18 maio 2015.

KUO, S.-R. et al. Anti-caveolin-1 Antibodies As Anti-Prostate Cancer Therapeutics. **Hybridoma**, v. 31, n. 2, p. 77–86, abr. 2012.

KYPTA, R. M.; WAXMAN, J. Wnt/ β -catenin signalling in prostate cancer. **Nature reviews. Urology**, v. 9, n. 8, p. 418–28, 19 ago. 2012.

L'EPLATTENIER, H. F. **Studies on the Pathogenesis and Management of Prostate Carcinoma in Dogs** H. F. L'Eplattenier. [s.l: s.n.].

LEAN, F. Z. X.; KONTOS, S.; PALMIERI, C. ScienceDirect Expression of b - catenin and Mesenchymal Markers in Canine Prostatic Hyperplasia and Carcinoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 150, n. 4, p. 373–381, 2014.

LEROY, B. E. et al. Canine prostate carcinomas express markers of urothelial and prostatic differentiation. **Veterinary pathology**, v. 41, n. 2, p. 131–140, 1 mar. 2004.

LEROY, B. E.; NORTHRUP, N. Prostate cancer in dogs: Comparative and clinical aspects. **The Veterinary Journal**, v. 180, n. 2, p. 149–162, maio 2009.

LI, L.-C.; CARROLL, P. R.; DAHIYA, R. Epigenetic Changes in Prostate Cancer: Implication for Diagnosis and Treatment. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 2, p. 103–115, 19 jan. 2005.

LI, V. S. W. et al. Wnt Signaling through Inhibition of β -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1245–1256, jun. 2012.

LIU, G.-L. et al. Expression and significance of E-cadherin, N-cadherin, transforming growth factor- β 1 and Twist in prostate cancer. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 7, n. 1, p. 76–82, jan. 2014.

LÓPEZ-KNOWLES, E. et al. Cytoplasmic localization of beta-catenin is a marker of poor outcome in breast cancer patients. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 19, n. 1, p. 301–309, 1 jan. 2010.

MACDONALD, B. T.; TAMAI, K.; HE, X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. **Developmental Cell**, v. 17, n. 1, p. 9–26, jul. 2009.

MATSUZAKI, P. et al. Immunohistochemical Characterization of Canine Prostatic Intraepithelial Neoplasia. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142, n. 1, p. 84–88, jan. 2010.

MORGAN, C. et al. The role of adhesion molecules as biomarkers for the aggressive prostate cancer phenotype. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–8, 16 dez. 2013.

NASSAR, Z. D. et al. Caveola-forming proteins caveolin-1 and PTRF in prostate

cancer. **Nature reviews. Urology**, v. 10, n. 9, p. 529–536, 13 set. 2013.

OMABE, M.; EZEANI, M. Infection, inflammation and prostate carcinogenesis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 6, p. 1195–1198, ago. 2011.

PALAPATTU, G. S. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 7, p. 1170–1181, 21 out. 2004.

PALMIERI, C. et al. A retrospective analysis of 111 canine prostatic samples: Histopathological findings and classification. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 3, p. 568–573, dez. 2014.

PALMIERI, C.; GRIECO, V. Proposal of Gleason-like grading system of canine prostate carcinoma in veterinary pathology practice. **Research in Veterinary Science**, v. 103, p. 11–15, dez. 2015.

POLAKIS, P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1332, n. 3, p. F127–F147, jun. 1997.

QUEST, A. F. G. et al. The caveolin-1 connection to cell death and survival. **Current molecular medicine**, v. 13, n. 2, p. 266–281, 1 fev. 2013.

RAMESH, S.; NASH, J.; MCCULLOCH, P. G. Reduction in membranous expression of beta-catenin and increased cytoplasmic E-cadherin expression predict poor survival in gastric cancer. **British journal of cancer**, v. 81, n. 8, p. 1392–7, 1999.

RAZANI, B.; WOODMAN, S. E.; LISANTI, M. P. Caveolae: from cell biology to animal physiology. **Pharmacological reviews**, v. 54, n. 3, p. 431–67, 1 set. 2002.

RICHIARDI, L. et al. Promoter methylation in APC, RUNX3, and GSTP1 and mortality in prostate cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 19, p. 3161–3168, 2009.

RICHIARDI, L. et al. Methylation of APC and GSTP1 in non-neoplastic tissue adjacent to prostate tumour and mortality from prostate cancer. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68162, 9 jul. 2013.

RODRIGUES, M. M. P. et al. COX-2 and TGF- β expression in proliferative disorders of canine prostate. **Brazilian Journal Of veterinary Pathology**, v. 3, n. 1, p. 31–36, 2010.

RODRIGUES, M. M. P. et al. Overexpression of Vimentin in Canine Prostatic Carcinoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 144, n. 4, p. 308–311,

2011.

RODRIGUES, M. M. P. et al. Role of Adhesion Molecules and Proliferation Hyperplasic, Pre Neoplastic and Neoplastic Lesions in Canine Prostate.

Pakistan Journal of Biological Sciences, v. 16, n. 21, p. 1324–1329, 1 dez. 2013a.

RODRIGUES, M. M. P. et al. Role of Adhesion Molecules and Proliferation Hyperplasic, Pre Neoplastic and Neoplastic Lesions in Canine Prostate.

Pakistan Journal of Biological Sciences, v. 16, n. 21, p. 1324–1329, 1 dez. 2013b.

ROSOL, T. J. et al. Animal models of bone metastasis. **Cancer**, v. 97, n. 3 Suppl, p. 748–757, 1 fev. 2003.

ROSSIGNOL, A et al. Histologie et immunohistochimie de la prostate du chien . Validité du modèle animal pour l ' étude des lésions précancéreuses. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 1, n. 155, p. 21–26, 2004.

ROWELL, J. L.; MCCARTHY, D. O.; ALVAREZ, C. E. Dog models of naturally occurring cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 7, p. 380–388, jul. 2011.

RUBIN, M. A et al. E-cadherin expression in prostate cancer: a broad survey using high-density tissue microarray technology. **Human pathology**, v. 32, n. 7, p. 690–7, jul. 2001.

SALIC, A. et al. Control of β -Catenin Stability. **Molecular Cell**, v. 5, n. 3, p. 523–532, mar. 2000.

SCHMALHOFER, O.; BRABLETZ, S.; BRABLETZ, T. E-cadherin, β -catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1-2, p. 151–166, 20 jun. 2009.

SHAFIEE, R. et al. Diagnostic investigations of canine prostatitis incidence together with benign prostate hyperplasia, prostate malignancies, and biochemical recurrence in high-risk prostate cancer as a model for human study. **Tumor Biology**, v. 36, n. 4, p. 2437–2445, 25 abr. 2015.

SHEN, M. M.; ABATE-SHEN, C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. **Genes & Development**, v. 24, n. 18, p. 1967–2000, 15 set. 2010.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 00, n. 0, p. n/a–n/a, dez. 2015.

SIMONS, B. W. et al. Wnt signaling though beta-catenin is required for prostate lineage specification. **Developmental biology**, v. 371, n. 2, p. 246–55, nov. 2012.

SMITH, J. Canine prostatic disease: A review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. **Theriogenology**, v. 70, p. 375–383, 2008.

SOTGIA, F. et al. Caveolin-1 and Cancer Metabolism in the Tumor Microenvironment: Markers, Models, and Mechanisms. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 7, n. 1, p. 423–467, 28 fev. 2012.

STAMOS, J. L.; WEIS, W. I. The β -Catenin Destruction Complex. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 1, p. a007898–a007898, 1 jan. 2013.

TAHIR, S. A et al. Tumor cell-secreted caveolin-1 has proangiogenic activities in prostate cancer. **Cancer research**, v. 68, n. 3, p. 731–9, 1 fev. 2008.

TERAZAKI, P. M. **Patrícia Matsuzaki Terazaki Caracterização da próstata canina quanto a aspectos envolvidos na evolução para o carcinoma prostático**. [s.l.] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2009.

TESKE, E. et al. Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, n. 1-2, p. 251–255, nov. 2002.

TOLEDO, D. C. et al. Caracterização histomorfológica da atrofia inflamatória proliferativa na próstata canina. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1372–1377, jun. 2010.

VALKENBURG, K. C. et al. Activation of Wnt/ β -catenin signaling in a subpopulation of murine prostate luminal epithelial cells induces high grade prostate intraepithelial neoplasia. **The Prostate**, v. 74, n. 15, p. 1506–1520, nov. 2014.

VALKENBURG, K. C.; HOSTETTER, G.; WILLIAMS, B. O. Concurrent Hepsin overexpression and adenomatous polyposis coli deletion causes invasive prostate carcinoma in mice. **The Prostate**, v. 75, n. 14, p. 1579–85, out. 2015.

VERRAS, M.; SUN, Z. Roles and regulation of Wnt signaling and beta-catenin in prostate cancer. **Cancer letters**, v. 237, n. 1, p. 22–32, 8 jun. 2006.

WANG, L. et al. Regulation of the phosphorylation and nuclear import and export of β -catenin by APC and its cancer-related truncated form. **Journal of cell science**, v. 127, n. Pt 8, p. 1647–59, 15 abr. 2014.

WANG, Y. et al. APC methylation predicts biochemical recurrence of patients with prostate cancer: a meta-analysis. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 9, p. 15575–80, 2015.

WATANABE, M. et al. APC gene mutations in human prostate cancer. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 26, n. 2, p. 77–81, abr. 1996.

WATERS, D. J. et al. Comparing the Age at Prostate Cancer Diagnosis in Humans and Dogs. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 22, p. 1686–1687, 20 nov. 1996.

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

WILLIAMS, T. M.; LISANTI, M. P. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. **American journal of physiology.**, v. 288, n. 3, p. C494–506, 27 mar. 2005.

WINKLER, S. et al. HMGA2 expression in a canine model of prostate cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 177, n. 2, p. 98–102, 2007.

YANG, G. et al. Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker. **Cancer research**, v. 59, n. 22, p. 5719–23, 15 nov. 1999.

YANG, G. et al. Combined c-Myc and caveolin-1 expression in human prostate carcinoma predicts prostate carcinoma progression. **Cancer**, v. 103, n. 6, p. 1186–1194, 2005.

YANG, G. et al. Caveolin-1 Upregulation Contributes to c-Myc-Induced High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Prostate Cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 10, n. 2, p. 218–229, 2012.

YOUNIS, L. K.; EL SAKKA, H.; HAQUE, I. The Prognostic Value of E-cadherin Expression in Breast Cancer. **International journal of health sciences**, v. 1, n. 1, p. 43–51, jan. 2007.

YU, X. et al. Activation of β -Catenin in mouse prostate causes HGPIN and continuous prostate growth after castration. **The Prostate**, v. 69, n. 3, p. 249–262, 15 fev. 2009.

ZANINI, D. A. et al. Environmental risk factors related to the development of canine non-Hodgkin's lymphoma. **Ciência Rural**, v. 43, n. 7, p. 1302–1308, jul. 2013.

FIGURES AND TABLES

Table 1. Histological classification of canine prostatic samples and Gleason score for PC.

Histological classification	n	Gleason score**
Normal prostate	10	
PIA*	10	
CaP*	10	
1. Single histological pattern		
• Cribriform		
a) With comedonecrosis	1	5 + 5 = 10
b) Without comedonecrosis	1	4 + 4 = 8
2. Mixed histological patterns		
• Cribriform with comedonecrosis, solid	2	5 + 5 = 10
• Solid, signet ring, small acinar/ductal	1	5 + 5 = 10
• Cribriform with comedonecrosis, solid e signet ring	1	5 + 5 = 10
• Cribriform without comedonecrosis, solid	1	4 + 5 = 9
• Cribriform with comedonecrosis, cribriform without comedonecrosis	1	5 + 4 = 9
• Small acinar/ ductal	2	3 + 3 = 6
Metastasis		
• Cribriform with comedonecrosis	2	
• Small acinar/ductal	1	
• Cribriform with comedonecrosis, small acinar/ ductal	1	

*According to PALMIERI et al.(2014) and **PALMIERI; GRIECO (2015)

Table 2. Primers sequences used for gene expression (RT-qPCR).

Primer	Forward	Reverse
<i>APC</i>	5'AGTTTGTGTTGGTGGTTTTAGG3'	5'ACCACCAAATACTAACACCC3'
<i>E-cadherin</i>	5'CAGCATGGACTCAGAAGACAGAAG3'	5'TTCGGGGCAGCTGATAGG3'
<i>β-catenin</i>	5'GGTTCGTGCCCATCAGGAT3'	5'GCTGCTGTGTTCCACCCATA 3'
<i>Caveolin-1</i>	5'CGCACACCAAGGAAATCGA3'	5'CACGTCGTCGTTGAGATGCT 3'
<i>HPRT</i>	5'AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC3'	5'-TTATAGTCAAGGGCATATCC-3'

Table 3. Primary antibodies used

Antibody	Manufacturer	Clone	Dilution	Incubation	Immunolocalization
Caveolin-1	Aviva system, San Diego, CA	AVARP09019-T100	1:1000	2 h	Cytoplasmic
APC	Abcam, Cambridge, USA	Ab15270	1:100	18 h	Cytoplasmic / nuclear
E-cadherin	Dako, Carpinteria, USA	NCH 38	1:200	18 h	Membranous/ Cytoplasmic
β-catenin	Spring Bioscience, Pleasanton, USA	E2261	1:200	18 h	Membranous/ nuclear/ Cytoplasmic

Table 4. Primers sequences used for methylation analysis

Primer	Forward	Reverse	Sequencing
APC	5'-CGACGGGAAGACAAGTTCATG-3'	5'-TCACCGCACACAGGCAAT-3'	5' GGGATTAGGTTAGGTAGG 3'

Table 5. Clinical information from dogs with PC that were used for gene and protein expression

ID	Neutered	Race	Age	Clinical Signs	Surgical Treatment	Survival Rate
H179/14	No	German Shepherd	13 years	Dyschezia, hematuria	No data	No data
CaP Ju	No	Pit Bull	8 years	Hematuria, diarrhea, vomit	Prostatectomy	3 months
N279/14	No	Mixed breed	16 years	Anorexia, vomit	None	Euthanasia
202013	No	Mixed breed	10 years	Lameness, urinary incontinence	None	Euthanasia
Pbtu 3/8	No	Cocker Spaniel	10 years	Cachexia	None	Euthanasia
H08/13	No	Mixed breed	10 years	Anorexia, tenesmus	Prostatectomy	2 years
H250/12	No	Scottish Terrier	13 years	Hematuria	None	ND
406-15H	No	Dachshund	10 years	ND	ND	ND
566	ND	Boxer	12 anos	ND	ND	ND

*ND= no medical data found

Table 6. Total density (%) of positive area in Normal prostate, PIA, PC and metastasis for each protein studied (mean $\pm$ standard deviation).

	APC	Caveolin-1	E-cadherin	β -catenin
Normal prostate	30.89 $\pm$ 6.08	4.22 $\pm$ 2.72	16.06 $\pm$ 2.46	18.24 $\pm$ 3.25
PIA	22.07 $\pm$ 3.42	5.79 $\pm$ 2.48	10.94 $\pm$ 2.82	12.62 $\pm$ 1.45
PC	28.91 $\pm$ 6.76	11.17 $\pm$ 4.09	18.83 $\pm$ 7.17	26.93 $\pm$ 5.03
Metastasis	27.97 $\pm$ 6.57	11.67 $\pm$ 1.73	15.86 $\pm$ 4.90	19.14 $\pm$ 6.76
P value	0.0112	<0.0001	0.069	<0.0001

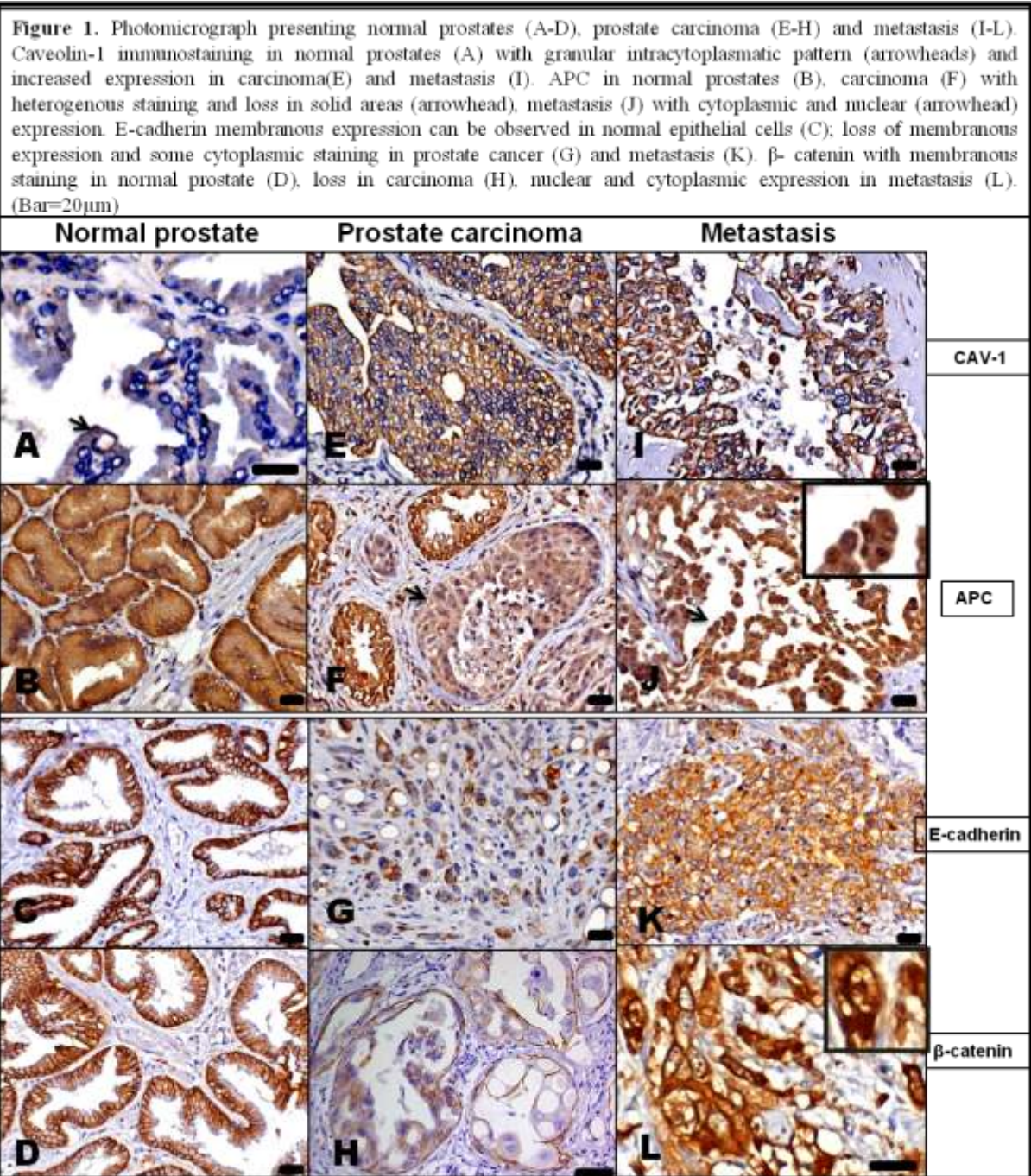
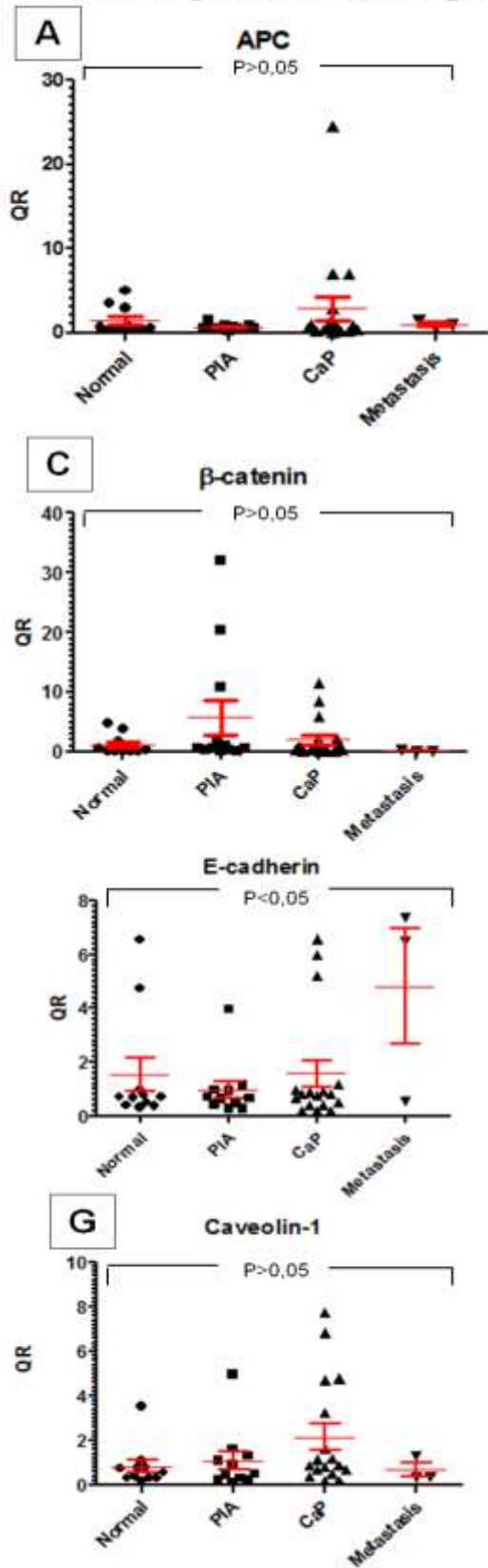


Figure 2. Comparisons between different lesions groups of relative quantification (left column) and positive percent area of immunohistochemistry (right).

Gene expression (RT-qPCR)



Protein expression (IHC)

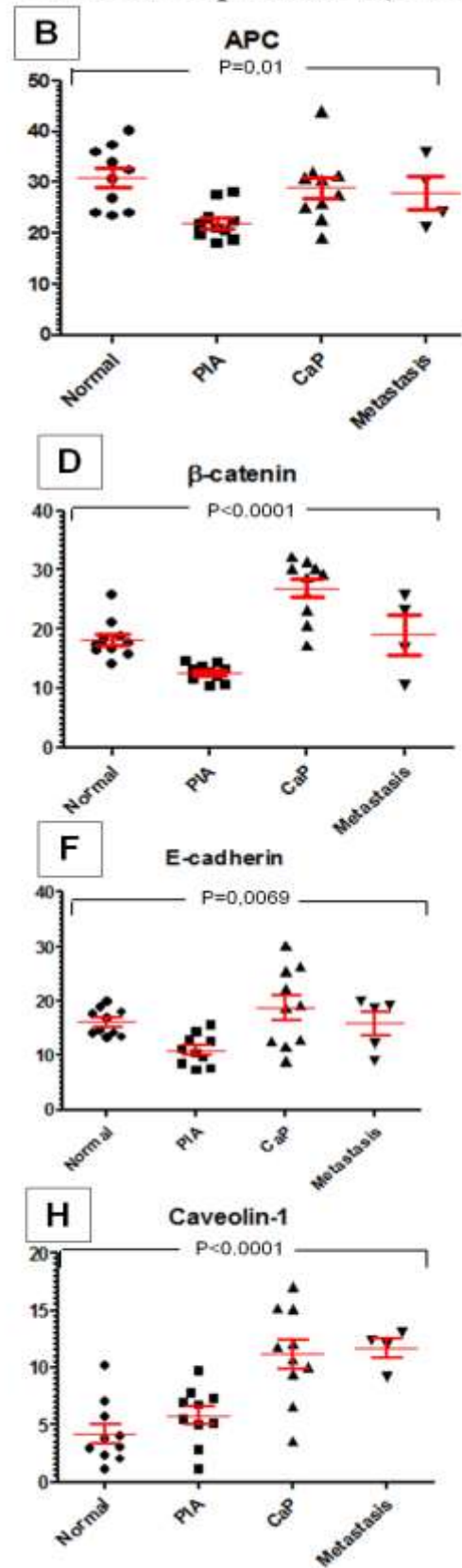
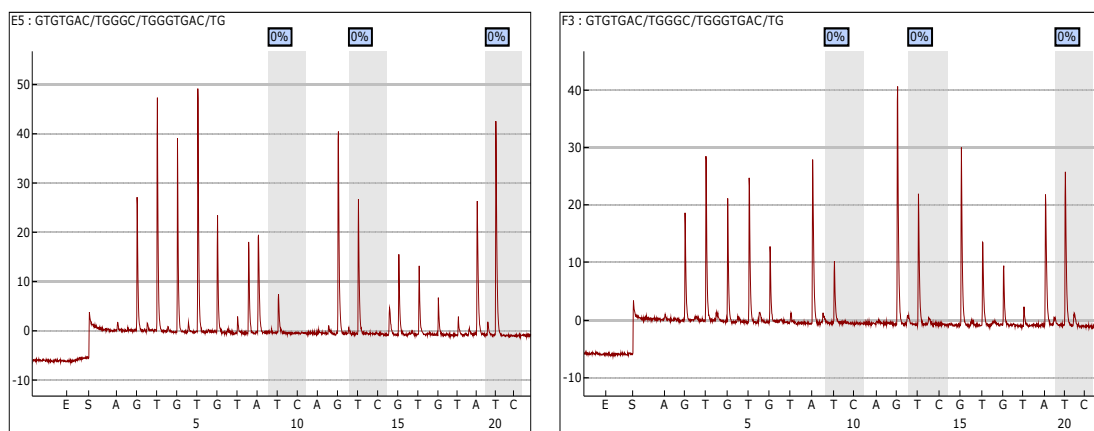
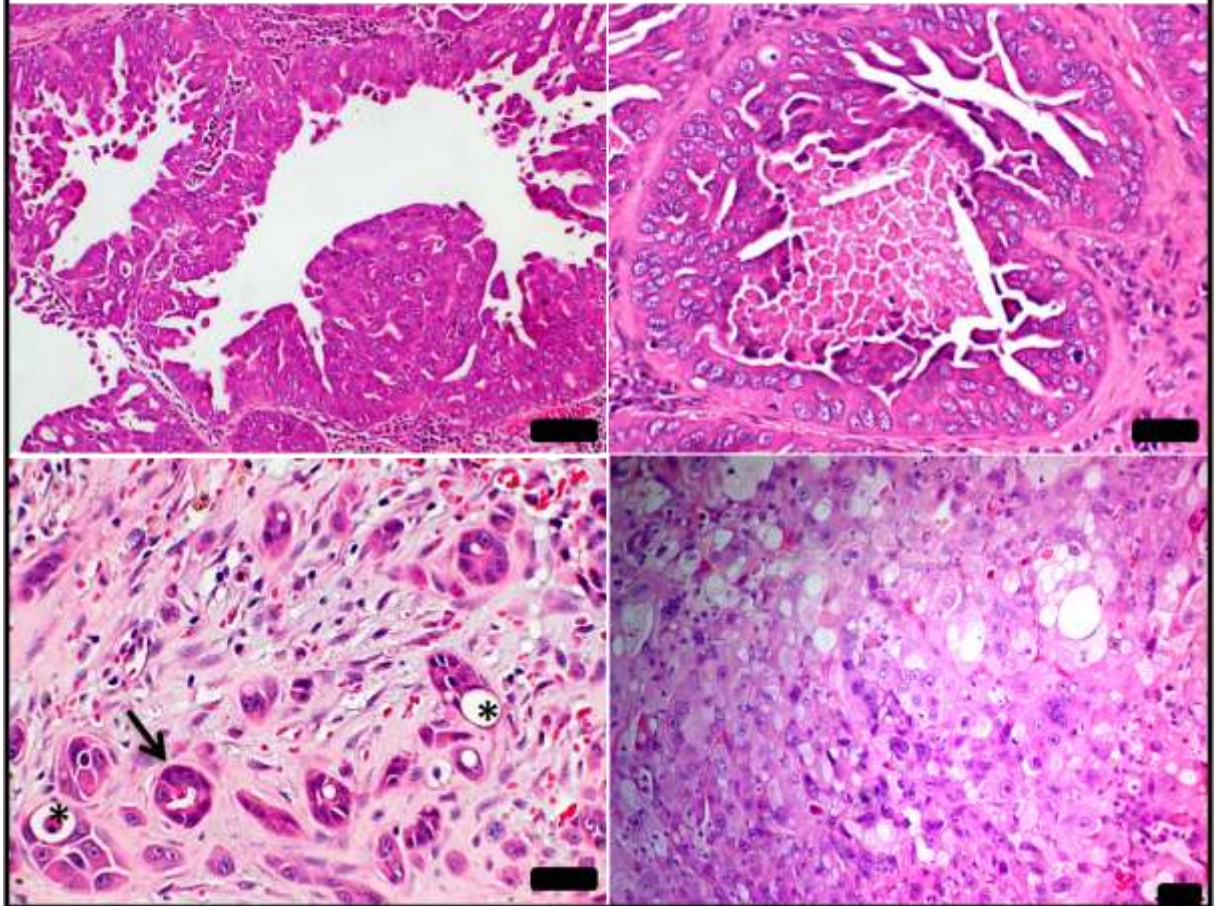


Figure3. APC pyrograms in normal prostate (left) and PC samples (right). Pyrogram exhibit 3 CpG sites and methylation rates.



Supplementary Figure 1:

Figure 1. Histopathological patterns of prostate carcinoma in dogs observed. A) Cribriform pattern. B) Cribriform with comedonecrosis. C)Small acinar/ ductal (arrowheads) and small acinar (asterisk). D) Solid pattern.



NORMAS DA REVISTA *VETERINARY AND COMPARATIVE ONCOLOGY*

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscripts are professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Spacing and Margins: All manuscripts should be double-spaced with 1-inch (2.5-cm) margins throughout. A common and easy-to-read type face such as Arial, Helvetica, Georgia or Times New Roman and a font size of 11 points or larger should be utilized throughout the manuscript.

5.2. Structure

For Editorials and Short Communications, the style should be of continuous prose with appropriate references, figures and tables as required. For a commissioned review paper, the structure will depend on the subject matter but the use of clear descriptive figures is strongly encouraged.

For all original research manuscripts submitted to VCO: The manuscript should include: title page and abbreviated title for use as a running headline; a self-contained abstract of the paper (150 words in length); introduction; materials and methods; results; discussion; acknowledgements (if any); references; figures and tables; captions to figures (on a separate page).

Title Page: title of paper; names of the authors; address of the place at which the work was carried out (including postal and email addresses for corresponding author).

Abstract: 150 words in length and between four and six keywords. Please note that the abstract should be submitted on a separate page to the rest of the manuscript.

Optimizing Your Abstract for Search Engines: Many students and researchers looking for information online will use search engines such as Google, Yahoo or similar. By optimizing your article for search engines, you will increase the chance of someone finding it. This in turn will make it more likely to be viewed and/or cited in another work. We have compiled these [guidelines](#) to enable you to maximize the web-friendliness of the most public part of your article.

5.3. References

References should be cited in the text by superscript numbers after punctuation, in order of citation. The editor and publisher recommend that citation of online published papers and other material should be done via a DOI (digital object identifier), which all reputable online published material should have - see www.doi.org for more information. If an author cites anything which does not have a DOI they run the risk of the cited material not being traceable.

Use the reference style of the National Library of Medicine

(http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html), including the abbreviations of journal titles.

List all authors when there are 6 or fewer; when there are 7 or more authors, list only the first 6 and add "et al."

Do not use *ibid.* or *op cit.*

Include an "available from" note for documents that may not be readily accessible.

When citing an article or book **accepted** for publication but **not yet published**, include the title of the journal (or name of the publisher) and the year of expected publication.

Include references to unpublished material in the text, not in the references (for example, papers presented orally at a meeting; unpublished work [personal communications, papers in preparation]), and submit a letter of permission from the cited persons to cite such communications (in general, avoid citations to unpublished scientific results).

Ensure that URLs used as references are active and available (the references should include the date on which the author accessed the URL).

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be input on separate pages together with a suitable caption at the top of each table. Column headings should be kept as brief as possible, and indicate units of measure in parentheses.

Figures: Drawings and graphs should be supplied as electronic files. Label axes appropriately and clearly. Please use a selection of the following symbols: +, -, £, i, r, φ, ~, p, q. Authors are asked where possible to draw diagrams to one of the following widths, including lettering: 168 mm, 354 mm. During reproduction, the diagrams can be reduced to half of their original size; please ensure, therefore, that lettering can withstand such a reduction. Authors are asked to use the minimum amount of descriptive matter on graphs and drawings but rather to refer to curves, points, etc., by symbols and place the descriptive matter in the caption. The figures should be numbered in a consecutive series of figures using Arabic numerals.

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (line art) or TIFF (halftone/photographs) files only. Microsoft PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programs. Scans (TIFF only) should have a resolution of at least 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). Please submit the data for figures in black and white or submit a [Colour Work Agreement Form](#) (see Colour Charges below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: line art: >600 dpi; halftones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at our guidelines for figures:

<http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Check your electronic artwork before submitting it:

<http://authorservices.wiley.com/bauthor/echecklist.asp>

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publisher.

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publisher.

Colour Charges: It is the policy of VCO for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, the Publisher requires you to complete and return a [Colour Work Agreement Form](#) before your paper can be published. Any article received by us with colour work will not be published until the form has been returned. If you are unable to access the internet, or are unable to download the form, please contact the Production Editor (vco@wiley.com).

Figure Legends: Legends should be provided in double spacing on a separate page but grouped together.

5.5. Supporting Information

Publication in electronic formats has created opportunities for adding details or whole sections in the electronic version only. Authors need to work closely with the editors in developing or using such new publication formats.

Supporting Information, such as data sets or additional figures or tables, that will not be published in the print edition of *Veterinary and Comparative Oncology*, but which will be viewable via the online edition, can be submitted.

It should be clearly stated at the time of submission that the Supporting Information is intended to be made available through the online edition. If the size or format of the Supporting Information is such that it cannot be accommodated on the journal's website, the author agrees to make the Supporting Information available free of charge on a permanent website, to which links will be set up from the journal's website. The author must advise Wiley-Blackwell if the URL of the website where the Supporting Information is located changes. The content of the Supporting Information must not be altered after the paper has been accepted for publication.

The availability of Supporting Information should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supporting Information' and providing titles of figures, tables, etc. In order to protect reviewer anonymity, material posted on the author's website cannot be reviewed. The Supporting Information is an integral part of the article and will be reviewed accordingly.

Extra issues: Larger papers or monographs may be published as additional issues (numbered as the ordinary issues), the full cost being paid by the author. Further information may be obtained from the editors.

Writing For Publication in Veterinary Medicine can be accessed at the following link:
<http://www.wiley.com/WileyCDA/Section/id-612222.html>

6. AFTER ACCEPTANCE

CAPÍTULO 3

DISCUSSÃO GERAL

A alta prevalência de CaP em homens e cães, seu desenvolvimento de forma espontânea e similaridades clínicas, favorecem o cão como um modelo de estudo para o desenvolvimento das alterações prostáticas (RODRIGUES et al., 2011). Nossos resultados mostram a importância de alguns genes e suas respectivas proteínas sabidamente fundamentais na carcinogênese e metástase prostática humana como a Caveolina-1, APC, E-caderina e β -catenina. Como relatado previamente para CaPs humanos, observamos nas lesões prostáticas do cão, diminuição da expressão membranosa de E-caderina e β -catenina, translocação da β -catenina da membrana para o citoplasma/núcleo e aumento da expressão gênica e proteica de CAV-1. No entanto, diferentemente do carcinoma prostático humano, no cão não foi observada hipermetilação do gene *APC*, nem perda da expressão gênica e proteica. Esse resultado indica que a metilação não é um mecanismo de regulação do gene *APC*, no cão. Assim, o cão pode representar um bom modelo de estudo para a doença humana, no entanto, apresenta particularidades genômica não compartilhadas pelos CaPs humanos.

Uma das proteínas de membrana que tem sido estudada como marcador para progressão tumoral e alvo de terapia é a Caveolina-1 (KLEIN et al., 2015). Nosso estudo demonstrou expressão gênica com aumento gradual na PIA, carcinoma e metástases, bem como a marcação intracitoplasmática granular nas células epiteliais prostáticas, com aumento significativo na distribuição intracitoplasmática dos CaP e metástases. Além disso, as amostras com menores escores de Gleason (escore 6) apresentavam menor concentração na marcação intracitoplasmática quando comparados com tumores apresentando escores de Gleason 9 e 10. Em humanos, a expressão de Caveolina-1 está positivamente correlacionada com escore de Gleason mais elevado (KARAM et al., 2007), menor tempo de recorrência da doença após

terapia e resistência terapêutica (KUO et al., 2012; QUEST et al., 2013). Nosso estudo sugere uma relação dessa proteína com o processo carcinogênico da próstata canina, devida ao aumento da concentração citoplasmática dessa proteína nas lesões pré-neoplásicas (PIA) e nos carcinomas.

Um achado interessante deste estudo foi a marcação citoplasmática da proteína APC nas amostras de CaPs e no grupo de metástases. Foi possível notar diminuição na intensidade do APC citoplasmático nos CaPs, principalmente nas áreas sólidas e em algumas lesões metastáticas. Notou-se marcação nuclear do APC em quatro casos de CaP, sendo que estes apresentavam o padrão cribiforme como padrão único ou misto. Esses achados corroboram para a atuação do APC na carcinogênese e metástase, porém diferem com o descrito para os CaPs humanos, visto que o gene APC encontra-se hipermetilado em 75% das amostras de CaPs e consequentemente, não há expressão proteica do APC nas células neoplásicas. Nós verificamos o perfil de metilação do gene *APC* nas amostras de CaP canino e não encontramos alteração no padrão de metilação desse gene. Esse resultado corrobora com os achados de RT- qPCR e imuno-histoquímico que demonstraram, respectivamente, uma expressão gênica com tendência a ser maior nos carcinomas em relação a próstata normal e marcação citoplasmática desta proteína. Para a análise de metilação foi utilizado o sequenciamento de nova geração baseado na liberação do pirofosfato (pirosequenciamento). Esta técnica é considerada padrão ouro na análise de metilação, excluindo completamente a hipermetilação como mecanismo regulatório do gene

A expressão de β -catenina foi observada no citoplasma em metade das amostras de PIA, além de todos CaP e metástases, demonstrando um papel importante na progressão tumoral e a importância das lesões de PIA na carcinogênese prostática canina. Além disso, a expressão no núcleo somente observada nos CaPs e o aumento da expressão proteica reforça a importância da proteína na tumorigênese,

ativando a via WNT canônica a qual contribui para proliferação e sobrevivência celular (VERRAS; SUN, 2006).

As proteínas E-caderina e β -catenina possuem papel de adesão celular quando localizadas na membrana plasmática e a perda de expressão de ambas é um pré requisito para invasão e metástase de células neoplásicas (SCHMALHOFER; BRABLETZ; BRABLETZ, 2009), e importante papel na transição epitelial-mesenquimal em próstatas caninas (FONSECA-ALVES et al., 2015). A E-caderina apresentou diferença estatística entre os grupos, semelhante a Fonseca- Alves et al. (2013) (FONSECA-ALVES et al., 2013). Notou-se a perda de expressão membranosa da E-caderina nos CaP, com diferença maior nas áreas de padrão sólido dos tumores quando comparadas aos padrões adjacentes: cribiforme e pequenos ácinos. Achados compatíveis com a hipótese de que a perda de E-caderina é dinâmica para que haja desdiferenciação celular e assim migrar pelo estroma, vasos e metastatizar para outros locais (YOUNIS et al., 2007; FONSECA-ALVES et al., 2015) . Os valores aproximados, com tendência a ser maior nas amostras neoplásicas quando comparadas com próstatas normais, da expressão gênica e proteica pode ser explicada por esse dinamismo. Além disso, a expressão proteica é observada tanto na próstata normal quanto nos carcinomas, porém em localizações diferentes: membranosa e citoplasmática, respectivamente.

A marcação citoplasmática de E-caderina encontrada somente nos CaP, também já foi descrito em casos de câncer gástrico. Essa expressão citoplasmática pode estar correlacionada com os genes que produzem tal proteína, ou indiretamente como alterações na transcrição do gene ou interferência no complexo proteico (RAMESH et al., 1999).

De duas amostras (20%) de CaP e duas metástases (50%) que apresentam β -catenina nuclear, metade (1 CaP e 1 metástase) apresenta diminuição na expressão proteica de E-caderina, propondo uma perda de ligação destas no CaP e metástases, e disponibilização da β -catenina para acúmulo no núcleo. Nestas duas2 amostras de

CaP com expressão de β -catenina nuclear, o APC possui menor expressão no citoplasma, o que sugere um papel do APC no citoplasma na destruição da β -catenina, porém de forma diferente que não seja a metilação. Além disso, metade (1/2) dos CaP com expressão de β -catenina nuclear apresentava também APC nuclear, propondo uma mutação/ desregulação do APC nuclear e consequente acúmulo no núcleo de β -catenina. Apesar dessa desregulação em algumas amostras, no geral observa-se nos carcinomas uma expressão gênica e proteica do APC maior do que da β -catenina, comparando-se com as próstatas normais, sugerindo um controle da β -catenina, impedindo assim seu acúmulo no núcleo. Observou-se que há uma tendência de aumento de expressão gênica e proteica de β -catenina nos carcinomas, em relação as próstatas normais, entretanto, assim como no caso da E-caderina, a expressão em ambas existe, porém em localizações diferentes. Embora haja esse acúmulo de β -catenina no citoplasma, apenas as fosforiladas deslocam-se para o núcleo e possui atividade transcricional (FUXE; KARLSSON, 2012), o que justifica as poucas amostras dessa proteína no núcleo, sendo necessário outras formas para avaliar essa etapa.

Diante do exposto nosso estudo corrobora para a importância da desorganização do complexo E-caderina / β -catenina e interação do complexo APC- β -catenina, que podem alterar a via canônica do WNT.

CONCLUSÕES GERAIS

Nossos resultados foram, por vezes, semelhantes aos relatados em carcinomas prostáticos humanos, revelando similaridades entre o proposto modelo de estudo canino e o homem. Sendo assim, a Caveolina- 1, APC, E-caderina e β -catenina, proteínas envolvidas na via de sinalização WNT canônica e adesão celular, indicam papéis fundamentais na carcinogênese e metástase prostática canina. Devido essas semelhanças, o estudo em cães pode favorecer o entendimento sobre a clínica, tratamento, marcadores moleculares e prognóstico no homem sobre o CaP e metástases.

BIBLIOGRAFIA

AKTER, S. H. et al. Different Growth Patterns of Canine Prostatic Carcinoma Suggests Different Models of Tumor-Initiating Cells. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 6, p. 1027–1033, 1 nov. 2015.

ALSHENAWY, H. A.; ALI, M. A. E.-H. A. E.-A. Differential caveolin-1 expression in colon carcinoma and its relation to E-cadherin- β -catenin complex. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 17, n. 6, p. 476–482, dez. 2013.

ANASTAS, J. N.; MOON, R. T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 1, p. 11–26, 21 dez. 2012.

BAETKE, S. C. et al. Molecular Pathways Involved in Prostate Carcinogenesis: Insights from Public Microarray Datasets. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49831, 20 nov. 2012.

BJERKE, G. A et al. Prostate cancer induced by loss of Apc is restrained by TGF β signaling. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92800, 20 mar. 2014.

BRUXVOORT, K. J. et al. Inactivation of Apc in the mouse prostate causes prostate carcinoma. **Cancer Research**, v. 67, p. 2490–2496, 2007.

CERVANTES-ARIAS, A.; PANG, L. Y.; ARGYLE, D. J. Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental mechanism underlying the cancer phenotype. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 11, n. 3, p. 169–184, set. 2013.

CHAW, S. Y. et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers – E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin – in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. **Oral Oncology**, v. 48, n. 10, p. 997–1006, out. 2012.

CHEN, G. et al. Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. **Cancer**, v. 101, n. 6, p. 1345–56, 15 set. 2004.

CHIAM, K.; RICCIARDELLI, C.; BIANCO-MIOTTO, T. Epigenetic biomarkers in prostate cancer: Current and future uses. **Cancer letters**, v. 342, n. 2, p. 248–56, 28 jan. 2014.

CLEVERS, H.; NUSSE, R. Wnt/??-catenin signaling and disease. **Cell**, v. 149, n. 6, p.

1192–1205, jun. 2012.

CORNELL, K. K. et al. Clinical and pathologic aspects of spontaneous canine prostate carcinoma: A retrospective analysis of 76 cases. **The Prostate**, v. 45, n. 2, p. 173–183, 1 out. 2000.

DE MARZO, A. M. et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256–269, abr. 2007.

DE NUNZIO, C. et al. The Controversial Relationship Between Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer: The Role of Inflammation. **European Urology**, v. 60, n. 1, p. 106–117, jul. 2011.

DING, Y. et al. Beta-catenin stabilization extends regulatory T cell survival and induces anergy in nonregulatory T cells. **Nature medicine**, v. 14, n. 2, p. 162–9, 3 fev. 2008.

DORSO, L. et al. Variability in weight and histological appearance of the prostate of beagle dogs used in toxicology studies. **Toxicologic pathology**, v. 36, p. 917–925, 2008.

DRIVALOS, A. et al. The role of the cell adhesion molecules (integrins/cadherins) in prostate cancer. **International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology**, v. 37, n. 3, p. 302–6, jun. 2011.

EMAMI, K. H.; COREY, E. When prostate cancer meets bone: Control by wnts. **Cancer Letters**, v. 253, n. 2, p. 170–179, ago. 2007.

FALEIRO-RODRIGUES, C. et al. Prognostic value of E-cadherin immunoexpression in patients with primary ovarian carcinomas. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 15, n. 10, p. 1535–42, 1 out. 2004.

FODDE, R.; TOMLINSON, I. Nuclear beta-catenin expression and Wnt signalling: in defence of the dogma. **The Journal of pathology**, v. 221, n. 3, p. 239–41, jul. 2010.

FONSECA-ALVES, C. E. et al. Avaliação histológica da próstata de cães adultos sexualmente intactos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 596–602, jun. 2010.

FONSECA-ALVES, C. E. et al. Alterations of C-MYC, NKX3.1, and E-cadherin expression in canine prostate carcinogenesis. **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 12, p. 1250–1256, dez. 2013.

FONSECA-ALVES, C. E. et al. Evidence of epithelial–mesenchymal transition in canine prostate cancer metastasis. **Research in Veterinary Science**, v. 100, p. 176–181, jun. 2015.

FUXE, J.; KARLSSON, M. C. I. TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition: a link between cancer and inflammation. **Seminars in cancer biology**, v. 22, n. 5-6, p. 455–61, out. 2012.

GALVÃO, A. L. B. et al. Principais afecções da glândula prostática em cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 456–466, 2011.

GROVER, P. L.; MARTIN, F. L. The initiation of breast and prostate cancer. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 0143-3334, p. 1095–1102, 2002.

GUMULEC, J. et al. Caveolin-1 as a potential high-risk prostate cancer biomarker. **Oncology reports**, v. 27, n. 3, p. 831–41, 8 mar. 2012.

HENSEL, J.; THALMANN, G. N. Biology of Bone Metastases in Prostate Cancer. **Urology**, jan. 2016.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.]. v. 1

JAGGI, M. et al. Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer☆. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 23, n. 6, p. 402–406, nov. 2005.

JAMIESON, C.; SHARMA, M.; HENDERSON, B. R. Wnt signaling from membrane to nucleus: β -catenin caught in a loop. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 44, n. 6, p. 847–50, jun. 2012.

JOHNSTON, S. . et al. Prostatic disorders in the dog. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 405–415, jul. 2000.

KARAM, J. A. et al. Caveolin-1 overexpression is associated with aggressive prostate cancer recurrence. **The Prostate**, v. 67, n. 6, p. 614–22, 1 maio 2007.

KAWANO, Y. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. **Journal of cell science**, v. 116, n. Pt 13, p. 2627–2634, 1 jul. 2003.

KELLER, J. M. et al. A novel canine model for prostate cancer. **The Prostate**, v. 73, n. 9, p. 952–959, jun. 2013.

KIM, H. et al. δ -Catenin promotes E-cadherin processing and activates β -catenin-mediated signaling: Implications on human prostate cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 4, p. 509–521, abr. 2012.

KLEIN, D. et al. Endothelial Caveolin-1 regulates the radiation response of epithelial prostate tumors. **Oncogenesis**, v. 4, n. 5, p. e148, 18 maio 2015.

KUO, S.-R. et al. Anti-caveolin-1 Antibodies As Anti-Prostate Cancer Therapeutics. **Hybridoma**, v. 31, n. 2, p. 77–86, abr. 2012.

KYPTA, R. M.; WAXMAN, J. Wnt/ β -catenin signalling in prostate cancer. **Nature reviews. Urology**, v. 9, n. 8, p. 418–28, 19 ago. 2012.

L'EPLATTENIER, H. F. **Studies on the Pathogenesis and Management of Prostate Carcinoma in Dogs H. F. L'Eplattenier**. [s.l.: s.n.].

LEAN, F. Z. X.; KONTOS, S.; PALMIERI, C. ScienceDirect Expression of b -catenin and Mesenchymal Markers in Canine Prostatic Hyperplasia and Carcinoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 150, n. 4, p. 373–381, 2014.

LEROY, B. E. et al. Canine prostate carcinomas express markers of urothelial and prostatic differentiation. **Veterinary pathology**, v. 41, n. 2, p. 131–140, 1 mar. 2004.

LEROY, B. E.; NORTHRUP, N. Prostate cancer in dogs: Comparative and clinical aspects. **The Veterinary Journal**, v. 180, n. 2, p. 149–162, maio 2009.

LI, L.-C.; CARROLL, P. R.; DAHIYA, R. Epigenetic Changes in Prostate Cancer: Implication for Diagnosis and Treatment. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 2, p. 103–115, 19 jan. 2005.

LI, V. S. W. et al. Wnt Signaling through Inhibition of β -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1245–1256, jun. 2012.

LIU, G.-L. et al. Expression and significance of E-cadherin, N-cadherin, transforming

growth factor- β 1 and Twist in prostate cancer. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 7, n. 1, p. 76–82, jan. 2014.

LÓPEZ-KNOWLES, E. et al. Cytoplasmic localization of beta-catenin is a marker of poor outcome in breast cancer patients. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 19, n. 1, p. 301–309, 1 jan. 2010.

MACDONALD, B. T.; TAMAI, K.; HE, X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. **Developmental Cell**, v. 17, n. 1, p. 9–26, jul. 2009.

MATSUZAKI, P. et al. Immunohistochemical Characterization of Canine Prostatic Intraepithelial Neoplasia. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142, n. 1, p. 84–88, jan. 2010.

MORGAN, C. et al. The role of adhesion molecules as biomarkers for the aggressive prostate cancer phenotype. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–8, 16 dez. 2013.

NASSAR, Z. D. et al. Caveola-forming proteins caveolin-1 and PTRF in prostate cancer. **Nature reviews. Urology**, v. 10, n. 9, p. 529–536, 13 set. 2013.

OMABE, M.; EZEANI, M. Infection, inflammation and prostate carcinogenesis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 6, p. 1195–1198, ago. 2011.

PALAPATTU, G. S. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 7, p. 1170–1181, 21 out. 2004.

PALMIERI, C. et al. A retrospective analysis of 111 canine prostatic samples: Histopathological findings and classification. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 3, p. 568–573, dez. 2014.

PALMIERI, C.; GRIECO, V. Proposal of Gleason-like grading system of canine prostate carcinoma in veterinary pathology practice. **Research in Veterinary Science**, v. 103, p. 11–15, dez. 2015.

POLAKIS, P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1332, n. 3, p. F127–F147, jun.

1997.

QUEST, A. F. G. et al. The caveolin-1 connection to cell death and survival. **Current molecular medicine**, v. 13, n. 2, p. 266–281, 1 fev. 2013.

RAMESH, S.; NASH, J.; MCCULLOCH, P. G. Reduction in membranous expression of beta-catenin and increased cytoplasmic E-cadherin expression predict poor survival in gastric cancer. **British journal of cancer**, v. 81, n. 8, p. 1392–7, 1999.

RAZANI, B.; WOODMAN, S. E.; LISANTI, M. P. Caveolae: from cell biology to animal physiology. **Pharmacological reviews**, v. 54, n. 3, p. 431–67, 1 set. 2002.

RICHIARDI, L. et al. Promoter methylation in APC, RUNX3, and GSTP1 and mortality in prostate cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 19, p. 3161–3168, 2009.

RICHIARDI, L. et al. Methylation of APC and GSTP1 in non-neoplastic tissue adjacent to prostate tumour and mortality from prostate cancer. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68162, 9 jul. 2013.

RODRIGUES, M. M. P. et al. COX-2 and TGF- β expression in proliferative disorders of canine prostate. **Brazilian Journal Of veterinary Pathology**, v. 3, n. 1, p. 31–36, 2010.

RODRIGUES, M. M. P. et al. Overexpression of Vimentin in Canine Prostatic Carcinoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 144, n. 4, p. 308–311, 2011.

RODRIGUES, M. M. P. et al. Role of Adhesion Molecules and Proliferation Hyperplasic, Pre Neoplastic and Neoplastic Lesions in Canine Prostate. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 21, p. 1324–1329, 1 dez. 2013a.

RODRIGUES, M. M. P. et al. Role of Adhesion Molecules and Proliferation Hyperplasic, Pre Neoplastic and Neoplastic Lesions in Canine Prostate. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 21, p. 1324–1329, 1 dez. 2013b.

ROSOL, T. J. et al. Animal models of bone metastasis. **Cancer**, v. 97, n. 3 Suppl, p. 748–757, 1 fev. 2003.

ROSSIGNOL, A et al. Histologie et immunohistochimie de la prostate du chien .

Validité du modèle animal pour l' étude des lésions précancéreuses. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 1, n. 155, p. 21–26, 2004.

ROWELL, J. L.; MCCARTHY, D. O.; ALVAREZ, C. E. Dog models of naturally occurring cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 7, p. 380–388, jul. 2011.

RUBIN, M. A et al. E-cadherin expression in prostate cancer: a broad survey using high-density tissue microarray technology. **Human pathology**, v. 32, n. 7, p. 690–7, jul. 2001.

SALIC, A. et al. Control of β -Catenin Stability. **Molecular Cell**, v. 5, n. 3, p. 523–532, mar. 2000.

SCHMALHOFER, O.; BRABLETZ, S.; BRABLETZ, T. E-cadherin, β -catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1-2, p. 151–166, 20 jun. 2009.

SHAFIEE, R. et al. Diagnostic investigations of canine prostatitis incidence together with benign prostate hyperplasia, prostate malignancies, and biochemical recurrence in high-risk prostate cancer as a model for human study. **Tumor Biology**, v. 36, n. 4, p. 2437–2445, 25 abr. 2015.

SHEN, M. M.; ABATE-SHEN, C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. **Genes & Development**, v. 24, n. 18, p. 1967–2000, 15 set. 2010.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 00, n. 0, p. n/a–n/a, dez. 2015.

SIMONS, B. W. et al. Wnt signaling though beta-catenin is required for prostate lineage specification. **Developmental biology**, v. 371, n. 2, p. 246–55, nov. 2012.

SMITH, J. Canine prostatic disease: A review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. **Theriogenology**, v. 70, p. 375–383, 2008.

SOTGIA, F. et al. Caveolin-1 and Cancer Metabolism in the Tumor Microenvironment: Markers, Models, and Mechanisms. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 7, n. 1, p. 423–467, 28 fev. 2012.

STAMOS, J. L.; WEIS, W. I. The β -Catenin Destruction Complex. **Cold Spring Harbor**

Perspectives in Biology, v. 5, n. 1, p. a007898–a007898, 1 jan. 2013.

TAHIR, S. A et al. Tumor cell-secreted caveolin-1 has proangiogenic activities in prostate cancer. **Cancer research**, v. 68, n. 3, p. 731–9, 1 fev. 2008.

TERAZAKI, P. M. **Patrícia Matsuzaki Terazaki Caracterização da próstata canina quanto a aspectos envolvidos na evolução para o carcinoma prostático**. [s.l.]

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2009.

TESKE, E. et al. Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, n. 1-2, p. 251–255, nov. 2002.

TOLEDO, D. C. et al. Caracterização histomorfológica da atrofia inflamatória proliferativa na próstata canina. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1372–1377, jun. 2010.

VALKENBURG, K. C. et al. Activation of Wnt/ β -catenin signaling in a subpopulation of murine prostate luminal epithelial cells induces high grade prostate intraepithelial neoplasia. **The Prostate**, v. 74, n. 15, p. 1506–1520, nov. 2014.

VALKENBURG, K. C.; HOSTETTER, G.; WILLIAMS, B. O. Concurrent Hepsin overexpression and adenomatous polyposis coli deletion causes invasive prostate carcinoma in mice. **The Prostate**, v. 75, n. 14, p. 1579–85, out. 2015.

VERRAS, M.; SUN, Z. Roles and regulation of Wnt signaling and beta-catenin in prostate cancer. **Cancer letters**, v. 237, n. 1, p. 22–32, 8 jun. 2006.

WANG, L. et al. Regulation of the phosphorylation and nuclear import and export of β -catenin by APC and its cancer-related truncated form. **Journal of cell science**, v. 127, n. Pt 8, p. 1647–59, 15 abr. 2014.

WANG, Y. et al. APC methylation predicts biochemical recurrence of patients with prostate cancer: a meta-analysis. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 9, p. 15575–80, 2015.

WATANABE, M. et al. APC gene mutations in human prostate cancer. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 26, n. 2, p. 77–81, abr. 1996.

WATERS, D. J. et al. Comparing the Age at Prostate Cancer Diagnosis in Humans and

Dogs. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 22, p. 1686–1687, 20 nov. 1996.

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

WILLIAMS, T. M.; LISANTI, M. P. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. **American journal of physiology**, v. 288, n. 3, p. C494–506, 27 mar. 2005.

WINKLER, S. et al. HMGA2 expression in a canine model of prostate cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 177, n. 2, p. 98–102, 2007.

YANG, G. et al. Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker. **Cancer research**, v. 59, n. 22, p. 5719–23, 15 nov. 1999.

YANG, G. et al. Combined c-Myc and caveolin-1 expression in human prostate carcinoma predicts prostate carcinoma progression. **Cancer**, v. 103, n. 6, p. 1186–1194, 2005.

YANG, G. et al. Caveolin-1 Upregulation Contributes to c-Myc-Induced High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Prostate Cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 10, n. 2, p. 218–229, 2012.

YOUNIS, L. K.; EL SAKKA, H.; HAQUE, I. The Prognostic Value of E-cadherin Expression in Breast Cancer. **International journal of health sciences**, v. 1, n. 1, p. 43–51, jan. 2007.

YU, X. et al. Activation of β -Catenin in mouse prostate causes HGPIN and continuous prostate growth after castration. **The Prostate**, v. 69, n. 3, p. 249–262, 15 fev. 2009.

ZANINI, D. A. et al. Environmental risk factors related to the development of canine non-Hodgkin's lymphoma. **Ciência Rural**, v. 43, n. 7, p. 1302–1308, jul. 2013.